

Università di Pisa

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e
Naturali

Corso di Laurea Specialistica in Scienze
Fisiche

Anno Accademico 2003–2004



Tesi di Laurea Specialistica

*Studio dell'influenza del campo astrocitario
sulla dinamica neuronale.*

Candidato:
Davide Pirino

Relatore:
Chiar.mo Prof. Leone Fronzoni

Indice

Introduzione	5
1 Astrociti e Onde di Calcio	7
1.1 Onde intercellulari di calcio	8
1.2 Il modello	11
1.3 Risultati delle Simulazioni	14
1.3.1 Tempi di rilassamento	16
1.3.2 Onde concentriche e l'ipotesi di diffusione passiva dell' IP_3	19
1.3.3 Onde di calcio a spirale	24
2 Il modello di Izhikevich	27
2.1 Le equazioni del modello di Izhikevich	29
2.2 Campo delle velocità	30
2.3 Dinamica neuronale	33
3 Simulazione di una rete neuro gliale	37
3.1 Il ruolo degli astrociti e l'interazione astrocita-neurone	37
3.2 Dinamica della rete neuro gliale	40
3.3 Risultati delle simulazioni	43
3.3.1 Rete con 8 astrociti per neurone	43
3.4 Rete autonoma	58
4 Reti con attività spontanea	65
4.1 Il modello di Izhikevich per neuroni dotati di attività spontanea	65
4.2 Simulazione di una rete autonoma	68
4.2.1 L'attività della rete senza astrociti	68
4.2.2 Statistica degli intervalli inter-spike	70
4.2.3 Rete autonoma con astrociti	74
5 Conclusioni	77

Bibliografia**79**

Introduzione

Il cervello umano è un sistema estremamente complesso formato da circa cento miliardi di cellule. Di queste cellule solo il dieci per cento sono neuroni. Il restante novanta per cento è costituito da un tipo di cellule chiamate cellule gliali. A loro volta le cellule gliali sono per la gran parte cellule a forma di stella denominate astrociti. Fino a qualche anno fa si riteneva che solamente i neuroni fossero responsabili dell'elaborazione dell'informazione all'interno del cervello e agli astrociti veniva attribuito soltanto il ruolo di fornire energia ai neuroni. Questo dogma, che vedeva il neurone come elemento principe del cervello umano, è caduto quando una serie di studi sperimentali (come per esempio quello di Portner e McCarthy del 1996) ha dimostrato che gli astrociti rispondono al potenziale di azione dei neuroni mediante dei recettori metabotropici di glutammato: ovvero sono in grado di 'intercettare' le comunicazioni tra i neuroni. L'attenzione della comunità scientifica si è quindi concentrata notevolmente sugli astrociti producendo un gran numero di lavori sia teorici che sperimentali.

Si sta attualmente cercando di capire quale ruolo abbiano gli astrociti nell'elaborazione dell'informazione all'interno del cervello. Il lavoro di tesi qui presentato rientra in questa corrente di ricerca; abbiamo cercato di mettere in evidenza, tramite la simulazione di una rete neuro-gliale, in che modo gli astrociti influenzano la dinamica neuronale.

Ci siamo dapprima concentrati (capitolo 1) sulla propagazione delle onde di calcio in una matrice di astrociti, ovvero abbiamo scelto un modello comportamentale di astrocita che fosse poco dispendioso dal punto di vista computazionale ma che permettesse la propagazione di onde di calcio all'interno di un agglomerato di cellule astrocitarie. Le onde di calcio costituiscono, infatti, il mezzo principale di comunicazione intercellulare. Una volta scelto il modello (modello di Atri et al.) lo abbiamo implementato su un computer utilizzando il metodo delle differenze finite. Le simulazioni implementate dimostrano che il modello ammette la propagazione di onde di calcio in una matrice di cellule astrocitarie; tali onde possono avere vari tipi di fronti d'onda (concentrici e a spirale) a seconda delle condizioni iniziali

che le generano. Avendo come scopo principale quello di simulare una rete neuro-gliale, il passo successivo è stato scegliere il modello di neurone da utilizzare per simulare il comportamento della rete puramente neurale. Anche in questo caso abbiamo scelto un modello (modello di Izhikevic) che fosse computazionalmente economico ma biologicamente verosimile. Il capitolo 2 è appunto dedicato all'analisi del modello, delle sue proprietà dinamiche e della sua verosimiglianza biologica. Utilizzando i due modelli scelti abbiamo dunque simulato alcune reti neuro-gliali (capitolo 3) cercando di capirne la dinamica. In particolare abbiamo notato che la presenza degli astrociti può mantenere attiva una rete neurale che, autonomamente, resterebbe nel suo stato di riposo. Abbiamo poi analizzato (capitolo 4) l'influenza degli astrociti sulla statistica degli intervalli inter-spike. Un risultato che riteniamo importante è che la presenza degli astrociti riduce la clusterizzazione temporale dei neuroni. Tale clusterizzazione, se coinvolge un grosso numero di neuroni, può essere associata a disturbi come l'epilessia. La presenza degli astrociti potrebbe quindi ridurre la presenza di scariche 'epiletiche' in una rete neurale.

Capitolo 1

Astroцити e Onde di Calcio

Negli anni passati si è reso sempre più evidente il ruolo delle onde intracellulari e intercellulari di calcio (Ca^{2+}) come elemento fondamentale per la comunicazione e per il controllo cellulare. L'emissione di onde di calcio da parte di una cellula permette di coordinare la risposta cellulare di aree molto estese. Ultimamente sono state osservate (vedi [1]) persino onde calcio spontanee in aree del tessuto dell'ippocampo, dimostrando così che gli astroцити hanno una loro attività autonoma di comunicazione che viene triggerata dai neuroni.

Per i nostri scopi è interessante capire come si propagano le onde di calcio all'interno di una matrice di astroцити: la velocità di propagazione, il tipo di fronte d'onda che si può formare ecc. È infatti praticamente certo che un tale tipo di comunicazione cellulare venga usato dalle cellule per organizzare un vasto gruppo di elementi in risposta ad un evento locale.

Come vedremo più avanti quando un neurone "spara" un impulso di tensione (*spike*) verso un altro neurone, negli astroцити vicino al neurone ricevente si genera un'onda di calcio che poi si propaga all'interno della matrice stessa. Grazie alla propagazione dell'onda anche gli astroцити lontani dal punto in cui è arrivato lo spike in qualche modo "sentono" tale impulso e possono modulare l'attività dei neuroni a loro vicini. È logico allora ipotizzare che le onde di calcio astroцитаріe servano come mediatori dell'attività neuronale su larga scala, ma ancora non è ben chiaro in che modo influenzino l'attività neuronale e quale sia il loro ruolo nell'elaborazione dell'informazione all'interno del cervello.

1.1 Onde intercellulari di calcio

La generazione di onde intercellulari di calcio può avvenire in diversi modi, ad esempio stimolando meccanicamente una parete cellulare. In figura (1.1) è visualizzata, tramite tecniche di imaging, la propagazione di un'onda di calcio in un network di astrociti e cellule di Müller estratte dalla retina di un topo. La regione gialla sovrapposta all'immagine indica la zona interessata dal fronte d'onda. L'onda è stata innescata stimolando il network meccanicamente tramite una punta che è ben visibile al centro della figura.

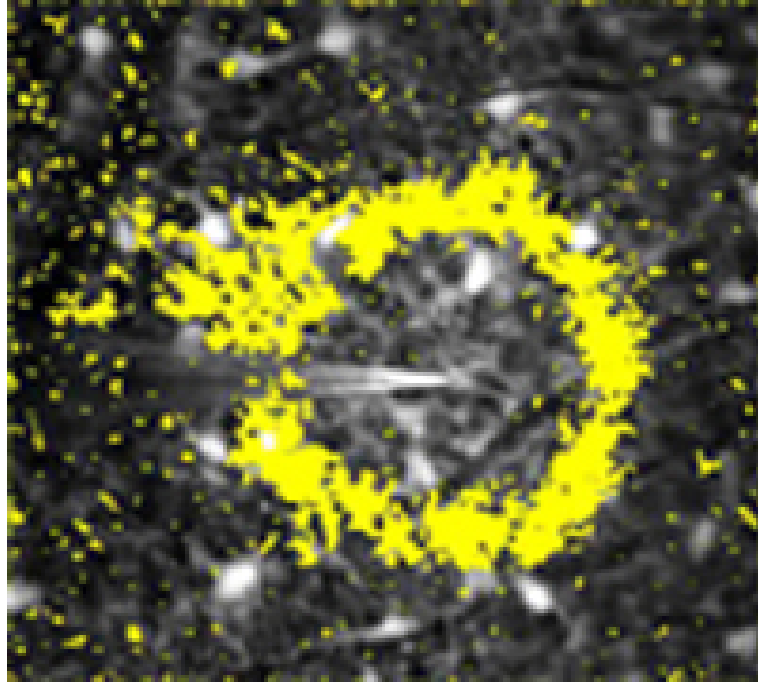


Figura 1.1: Propagazione di un'onda di calcio in un network di astrociti e cellule di Müller estratte dalla retina di un ratto. Lo stimolo meccanico è stato applicato per 10 ms nella zona al centro della figura. In giallo è stata evidenziata la zona interessata dal fronte d'onda (ovvero la regione in cui la concentrazione di Ca^{2+} è al di sopra di un valore di soglia fissato dallo sperimentatore). Immagine tratta da ([2]).

Noi siamo interessati al processo di generazione delle onde di calcio in seguito alla comunicazione neuronale. In figura (1.2) è schematizzato il processo di comunicazione tra due neuroni. Il neurone presinaptico (in basso) è il neurone che iniva l'impulso al neurone postsinaptico (in alto). La trasmissione del segnale avviene tramite il rilascio di glutammato da parte del

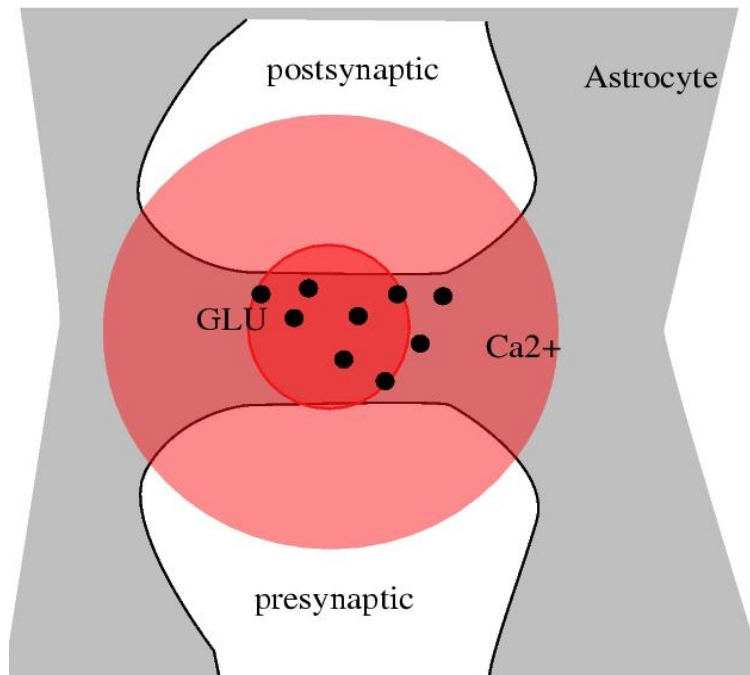


Figura 1.2: Il neurone presinaptico (in basso) rilascia glutammato (pallini neri) che si lega ai recettori posti sul compartimento postsinaptico. Il legame del glutammato ai recettori astrocitari innesca il propagarsi di un'onda di Ca^{2+} (cerchio rosso) (Immagine tratta da ([16])).

neurone presinaptico nello spazio intersinaptico (*synaptic cleft*). Il glutammato si legherà poi ai suoi recettori presenti sul compartimento postsinaptico attivando la trasmissione dell'impulso al neurone postsinaptico.

Tutti gli astrociti vicini allo spazio intersinaptico sono in grado di intercettare il rilascio di glutammato grazie alla presenza di opportuni recettori posti sulla loro membrana cellulare. Il legame del glutammato ai recettori astrocitari genera, grazie ad un processo di cui parleremo fra poco, un'onda di Ca^{2+} che si propaga di astrocita in astrocita (cerchio rosso nella figura (1.2)).

Il legame del glutammato ai recettori astrocitari produce rilascio di IP_3 all'interno dell'astrocita che, diffondendosi all'interno della cellula, arriva ai recettori di IP_3 posti sul reticolo endoplasmatico (un compartimento cellulare che svolge funzioni di supporto energetico per la cellula). Bisogna notare che, in condizioni di riposo, la concentrazione di calcio nel reticolo endoplasmatico (RE) è maggiore rispetto a quella del citoplasma, quindi è presente un gradino di calcio attraverso la membrana del RE. I recettori di IP_3 sono

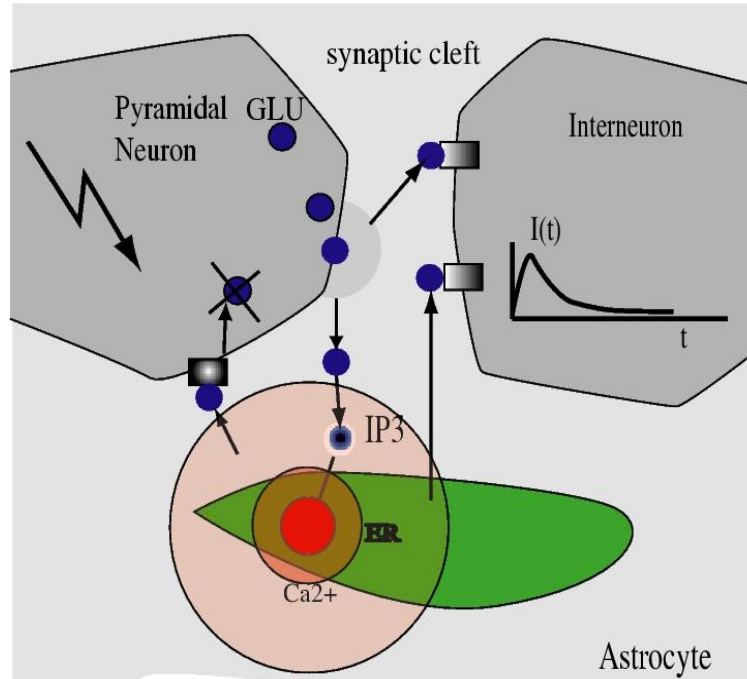


Figura 1.3: L'arrivo di un impulso di tensione sulla membrana presinaptica produce il rilascio di glutammato (GLU)(cerchi blu) nello spazio intersinaptico. Successivamente GLU si lega ai recettori posti sulla membrana postsinaptica e ai recettori astrocitari di glutammato. In conseguenza del legame del GLU ai recettori postsinaptici nel neurone postsinaptico viene iniettata una corrente eccitatoria che alza il valore del potenziale di membrana del neurone postsinaptico. Il legame del GLU ai recettori astrocitari di glutammato produce invece rilascio di IP_3 che apre i canali di calcio del reticolo endoplasmatico generando un processo autocatalitico (processo CICR) che produce un'onda di calcio (Immagine tratta da ([16])).

anche canali di calcio e, quando avviene il legame con l' IP_3 , tali canali si aprono rilasciando nel citoplasma una grande quantità di Ca^{2+} . A sua volta il calcio rilasciato attiva i recettori di IP_3 favorendo ulteriormente il rilascio di calcio in un processo autocatalitico chiamato CICR (*calcium induced-calcium release*). Tale emissione dal RE al citoplasma si interrompe quando la concentrazione di calcio citoplasmatico diventa elevata (supera un determinato valore di soglia), disattivando i recettori di IP_3 (il calcio fornisce quindi sia un feedback positivo che uno negativo). Da questo punto in poi le pompe di calcio invertono il flusso, riempiendo di nuovo il reticolo endoplasmatico di Ca^{2+} e riportando la cellula al suo stato di riposo.

Il processo CICR è stato proposto da molti ricercatori come il processo base per la generazione di onde intracellulari di calcio. La formazione di onde intercellulari è invece possibile se l'onda viene sostenuta da una cellula all'altra. Sulla membrana cellulare sono presenti delle aree, chiamate *gap junction*, che connettono una cellula con le sue vicine. Le *gap junction* sono delle collezioni di canali proteici che permettono il passaggio di ioni e di piccole molecole (ovvero di peso molecolare inferiore a 1000 daltons) con una permeabilità che varia a seconda della sostanza considerata. Noi indicheremo con F_p la permeabilità degli astrociti all' IP_3 e F_c la loro permeabilità al calcio. Il passaggio dell' IP_3 attraverso le *gap junction* permette di attivare il processo CICR anche nelle cellule adiacenti, è quindi evidente che possono crearsi le condizioni per la generazione di un'onda intercellulare di calcio ¹.

1.2 Il modello

In letteratura sono presenti molti modelli di astrociti più o meno complessi. La complessità di un modello è tanto maggiore quanto più il modello cerca di essere realistico. Le cellule sono infatti composte da vari "compartimenti" (reticolo endoplasmatico, mitocondri, apparato del golgi etc...), che svolgono funzioni più o meno differenti, immersi in un ambiente (il citoplasma) composto da varie sostanze (acqua, sali minerali e sostanze organiche).

Sviluppando un modello per il comportamento degli astrociti si possono quindi analizzare diversi livelli di complessità, considerando o meno la presenza dei vari compartimenti in cui è suddiviso. Chiaramente a seconda del comportamento che si è interessati a studiare i vari compartimenti contribuiscono in modo più o meno rilevante. Per economizzare i tempi di calcolo è quindi necessario dapprima capire quanto realistico deve essere il modello che si vuole implementare, ovvero quali compartimenti considerare e quali trascurare. Per i nostri scopi ci possiamo limitare a considerare l'astrocita come composto dal citoplasma e dal reticolo endoplasmatico. Il RE è infatti il principale artefice e regolatore del processo autocatalitico che genera le onde intracellulari di calcio.

Il modello che abbiamo scelto è quello sviluppato da Atri *et al.* (1993) (vedi [8]) per studiare le onde a spirale negli oociti dello *Xenopus Laevis* (un anfibio della famiglia dei pipidi). In questo modello sono presenti soltanto tre variabili per ogni astrocita: c , p e h , e sono tutte funzioni dello spazio (in due dimensioni) e del tempo. c indica la concentrazione di ioni Ca^{2+} nel citoplasma, p è la concentrazione di IP_3 sempre nel citoplasma e h indica la

¹Sebbene anche il calcio venga trasmesso dalle *gap junction* è la trasmissione di IP_3 che permette all'onda di autosostenersi.

frazione di recettori di IP_3 del RE che non sono stati inattivati dal Ca^{2+} . Le equazioni del modello sono le seguenti:

$$\frac{\partial p}{\partial t} = D_p \left(\frac{\partial^2 p}{\partial^2 x} + \frac{\partial^2 p}{\partial^2 y} \right) + \frac{1}{\tau_{IP_3}} (p_{eq} - p) \quad (1.1)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_c \left(\frac{\partial^2 c}{\partial^2 x} + \frac{\partial^2 c}{\partial^2 y} \right) + J_{flux} - J_{pump} \quad (1.2)$$

Con $D_p(D_c)$ abbiamo indicato il coefficiente di diffusione dell' $IP_3(Ca^{2+})$ all'interno dell'astrocita, p_{eq} è la concentrazione di equilibrio dell' IP_3 . J_{flux} modella il flusso di Ca^{2+} attraverso i canali di IP_3 . J_{pump} indica il rate con cui il Ca^{2+} viene pompato al di fuori del citoplasma verso il reticolo endoplasmatico e verso lo spazio extracellulare. In questo modello si ha:

$$J_{flux} = \gamma \frac{c}{k_\gamma + c} \quad (1.3)$$

$$J_{pump} = k_f \mu(p) \left(b + \frac{(1-b)c}{k_\gamma + c} \right) h \quad (1.4)$$

$\mu(p) = p/(k_\mu + p)$ indica la frazione di recettori di IP_3 che si sono legati all' IP_3 ed è una funzione crescente della concentrazione di IP_3 . Il termine $b + (1-b)c/(k_1 + c)$ controlla l'attivazione dei recettori di IP_3 da parte del Ca^{2+} . L'equazione per la variabile h (ovvero per la frazione di recettori di IP_3 che non sono stati inattivati dal Ca^{2+}) è la seguente:

$$\tau_h \frac{dh}{dt} = \frac{k_2^2}{k_2^2 + c^2} - h \quad (1.5)$$

In condizioni stazionarie si ha $h_{eq} = \frac{k_2^2}{k_2^2 + c_{eq}^2}$ dove il pedice eq indica le quantità all'equilibrio. La costante k_f indica il flusso di Ca^{2+} quando tutti i recettori di IP_3 sono aperti e attivi.

Le condizioni al bordo Le equazioni scritte in precedenza valgono solo all'interno di un astrocita, ma chiaramente è necessario modellizzare il flusso di calcio e di IP_3 attraverso le gap junction (vedi schema di figura (1.4)).

Come detto in precedenza le gap junction possiedono una permeabilità differente per ogni specie. Noi assumeremo che il flusso di una qualsiasi sostanza attraverso la membrana cellulare si proporziona alla differenza delle concentrazioni di tale sostanza ai due bordi della membrana. Il coefficiente di proporzionalità è proprio il coefficiente di permeabilità della gap junction.

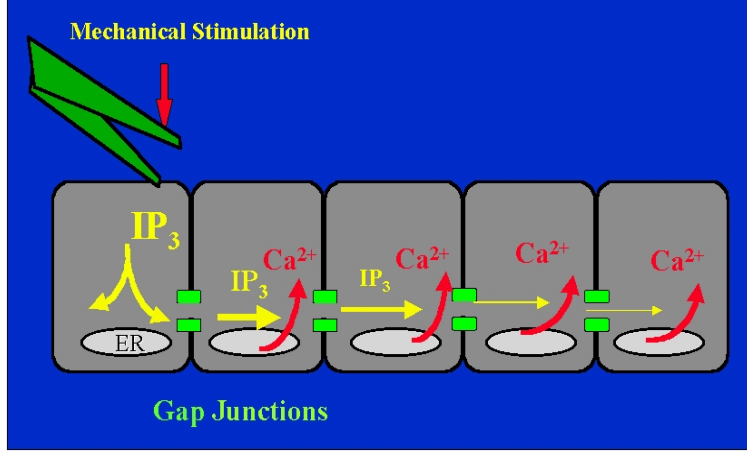


Figura 1.4: Schema di diffusione dell' IP_3 attraverso le gap junction. Uno stimolo meccanico produce il rilascio di IP_3 nella cellula. L' IP_3 apre i canali di calcio del reticolo endoplasmatico (in figura indicato con ER), attiva il processo CICR e attraverso le gap junction (canale in verde) passa nelle cellule adiacenti attivando anche in esse il rilascio di calcio.

Per semplicità consideriamo una membrana posizionata ad $x = 0$ in una dimensione spaziale. La condizione al bordo per le variabili p e c si scrive in questo caso:

$$D_p \frac{\partial p(0^-, t)}{\partial x} = D_p \frac{\partial p(0^+, t)}{\partial x} = F_p [p(0^+, t) - p(0^-, t)] \quad (1.6)$$

$$D_c \frac{\partial c(0^-, t)}{\partial x} = D_c \frac{\partial c(0^+, t)}{\partial x} = F_c [c(0^+, t) - c(0^-, t)] \quad (1.7)$$

Dove gli apici $-$ e $+$ indicano i limiti da sinistra e da destra rispettivamente. In tutte le simulazioni che sono state implementate le pareti cellulari sono rivolte lungo gli assi coordinati in modo da evitare complicazioni causate dalla orientazione della normale.

Per poter inserire le condizioni al bordo abbiamo seguito la procedura suggerita in [4]: si tratta di una tecnica largamente usata per lo studio delle onde a spirale nelle cellule del tessuto cardiaco. La tecnica consiste nell'ignorare le variazioni microscopiche introducendo un coefficiente di diffusione effettivo.

Consideriamo una linea formata da N cellule di lunghezza L . Il coefficiente di diffusione effettivo si ottiene assumendo che valga una relazione simile alla legge di Ohm, ovvero se $c(0, t) = C_0$ e $c(L, t) = C_L$ sono le concentra-

zioni della sostanza in questione ai bordi della catena di cellule si assume che il flusso della sostanza in condizioni stazionarie sia dato da:

$$J = \frac{D_e}{N L} (C_0 - C_L) \quad (1.8)$$

Si può dimostrare (vedi [5], [6]) che, quando L è piccolo rispetto alla costante di diffusione spaziale, si ha:

$$\frac{1}{D_e} = \frac{1}{D_c} + \frac{1}{L F_c} \quad (1.9)$$

L'ipotesi che L sia piccolo rispetto alla costante di diffusione spaziale ben si adatta al caso delle onde di calcio presenti nelle cellule del tessuto cardiaco; infatti i fronti d'onda in questo caso hanno un'estensione che ricopre un gran numero di cellule e quindi la presenza delle pareti cellulari ha come unico effetto quello di distorcere la forma del fronte d'onda. Nel caso delle onde di calcio per gli astrociti abbiamo un coefficiente di diffusione pari a $D_c = 20 \mu m^2 s^{-1}$ e ogni cellula ha un lato di circa $30 \mu m$. Il fronte d'onda è quindi contenuto più volte all'interno della cellula e non esiste un motivo a priori per poter giustificare l'utilizzo del coefficiente di diffusione effettivo nel caso degli astrociti. Tuttavia alcune simulazioni numeriche (vedi [4]) dimostrano che la velocità di un'onda piana in una matrice di astrociti è circa uguale a quella che si ottiene utilizzando il metodo del coefficiente di diffusione effettivo. In tutte le simulazioni che abbiamo effettuato in questo lavoro di tesi abbiamo sempre assunto valida la (1.9)

I parametri del modello I parametri del modello sono riportati nella tabella (1.1) e sono stati ottenuti da misure sperimentali su diversi tipi di cellule (vedi [4]). Non c'è nessuna ragione per supporre che tali dati siano corretti anche per le cellule gliali, tuttavia non è stato possibile reperire in letteratura valori numerici direttamente riferiti agli astrociti.

1.3 Risultati delle Simulazioni

Metodo numerico Per implementare al computer le equazioni del modello è stato utilizzato il metodo delle differenze finite. Il metodo consiste nell'approssimare le derivate parziali (sia spaziali che temporali) con delle differenze finite. Per applicare il metodo è necessario dividere il dominio D in cui vogliamo integrare le equazioni in una griglia di punti. Noi integreremo

Parametro	Significato	Valore
b	Frazione dei recettori di IP_3 quando $[Ca^{2+}] = 0$	0.111
k_1	Costante cinetica	$0.7\mu M$
k_2	Costante cinetica	$0.7\mu M$
D_c	Coefficiente di diffusione del $[Ca^{2+}]$	$20(\mu m)^2/s$
γ	Valore massimo per il rate J_{pump}	$2\mu M/s$
k_f	Flusso di $[Ca^{2+}]$ quando tutti i recettori di IP_3 sono attivi	$16.2\mu M/s$
k_γ	Costante cinetica delle pompe di calcio del reticolo endoplasmatico	$0.1\mu M$
k_μ	Costante cinetica per il binding dell' IP_3 ai suoi recettori	$0.7\mu M$
τ_h	Costante temporale per l'inibizione dei recettori di IP_3	$2s$
F_c	Permeabilità della membrana al calcio	$1.1(\mu m)/s$
F_p	Permeabilità della membrana all' IP_3	$5(\mu m)/s$
p_{eq}	Concentrazione di equilibrio per l' IP_3	$0.28\mu M$

Tabella 1.1: Tabella dei parametri usati per il modello di astrocita.

le equazioni (1.1)-(1.2) sempre su una matrice quadrata di astrociti e pertanto sarà sufficiente dividere ogni singolo astrocita in una matrice quadrata di punti (vedi figura (1.7)). L'integrazione nel tempo avviene in modo analogo dividendo l'asse dei tempi in passi temporali equispaziati. Prendiamo come esempio la derivata temporale della concentrazione di IP_3 , essa viene sostituita da:

$$\frac{\partial p}{\partial t} \approx \frac{p(t_{n+1}) - p(t_n)}{t_{n+1} - t_n} \quad (1.10)$$

Dove $t_n = n \Delta t$ e Δt è il passo temporale che si è scelto. Nel nostro caso $\Delta t = 1 \text{ ms}$. Le derivate spaziali si approssimano, come già anticipato, sovrapponendo al dominio in cui si vogliono integrare le equazioni una matrice quadrata di punti. Indichiamo con (x_i, y_j) le coordinate di questi punti, per la derivata parziale rispetto a x della concentrazione di IP_3 si ha allora:

$$\frac{\partial p}{\partial x} \approx \frac{p(x_{i+1}) - p(x_i)}{x_{i+1} - x_i} \quad (1.11)$$

In questo modo le equazioni (1.1)-(1.2) e (1.5) si trasformano in equazioni algebriche che possono essere facilmente risolte al computer.

1.3.1 Tempi di rilassamento

La prima simulazione è stata effettuata su una matrice quadrata di 20×20 astrociti, con condizioni al bordo assorbenti. Per condizioni al bordo assorbenti si intende che la permeabilità delle pareti cellulari delle cellule poste al bordo della matrice di astrociti è nulla (sia per il calcio che per l' IP_3). All'istante $t = 0$ l' IP_3 è all'equilibrio su tutta la matrice mentre la concentrazione di calcio è regolata a $0.08 \mu M$, un valore scelto vicino alla concentrazione di equilibrio per il calcio stimato dalle equazioni (1.1)-(1.2) e (1.5). Il valore iniziale per h è invece 1^2 .

Chiaramente non essendo il calcio e la variabile h al suo valore di equilibrio il sistema evolve e si adegua gradatamente al suo stato stabile.

In figura (1.5) è mostrata la concentrazione di calcio medio nella matrice al variare del tempo.

Si nota che la $[Ca^{2+}]$ parte dal valore iniziale di $0.08 \mu M$ e dopo un tempo di rilassamento τ_c di circa 15 secondi arriva al valore di equilibrio pari a $0.108 \mu M$. In questo modo siamo riusciti ad estrapolare sia il tempo di rilassamento del calcio che il suo esatto valore di equilibrio. Abbiamo eseguito

²La variabile h è sempre compresa tra 0 e 1 poichè indica la frazione di recettori di IP_3 che non sono stati inattivati dal Ca^{2+} , ovvero è equivalente ad una probabilità.

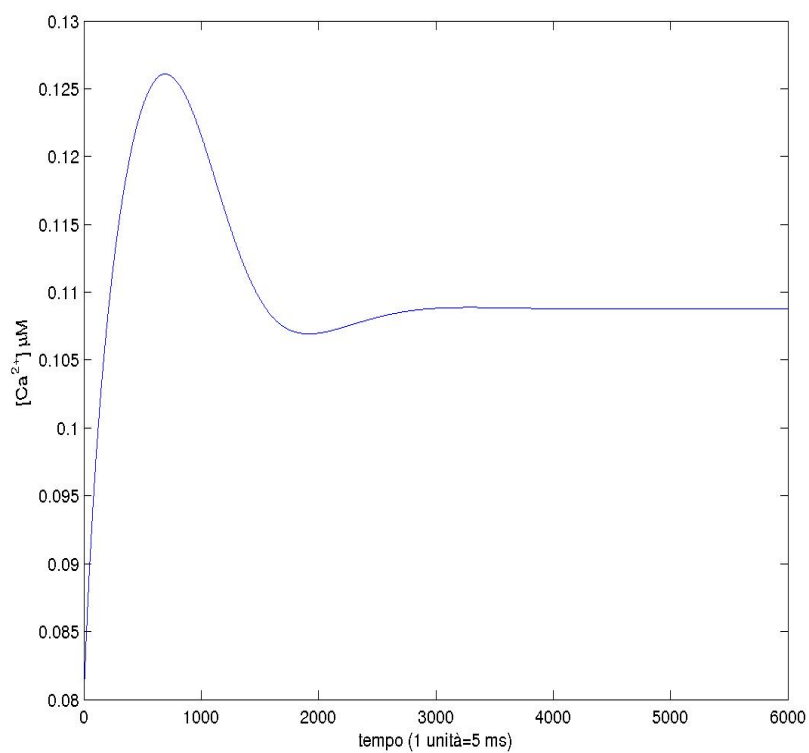


Figura 1.5: Concentrazione di calcio media espressa in micromoli in funzione del tempo. Un' unità temporale corrisponde a 5 millisecondi. Dopo circa 15 secondi il calcio arriva al suo valore di equilibrio.

anche la media spaziale per l' IP_3 e per la variabile h , il loro andamento temporale è riportato in figura (1.6).

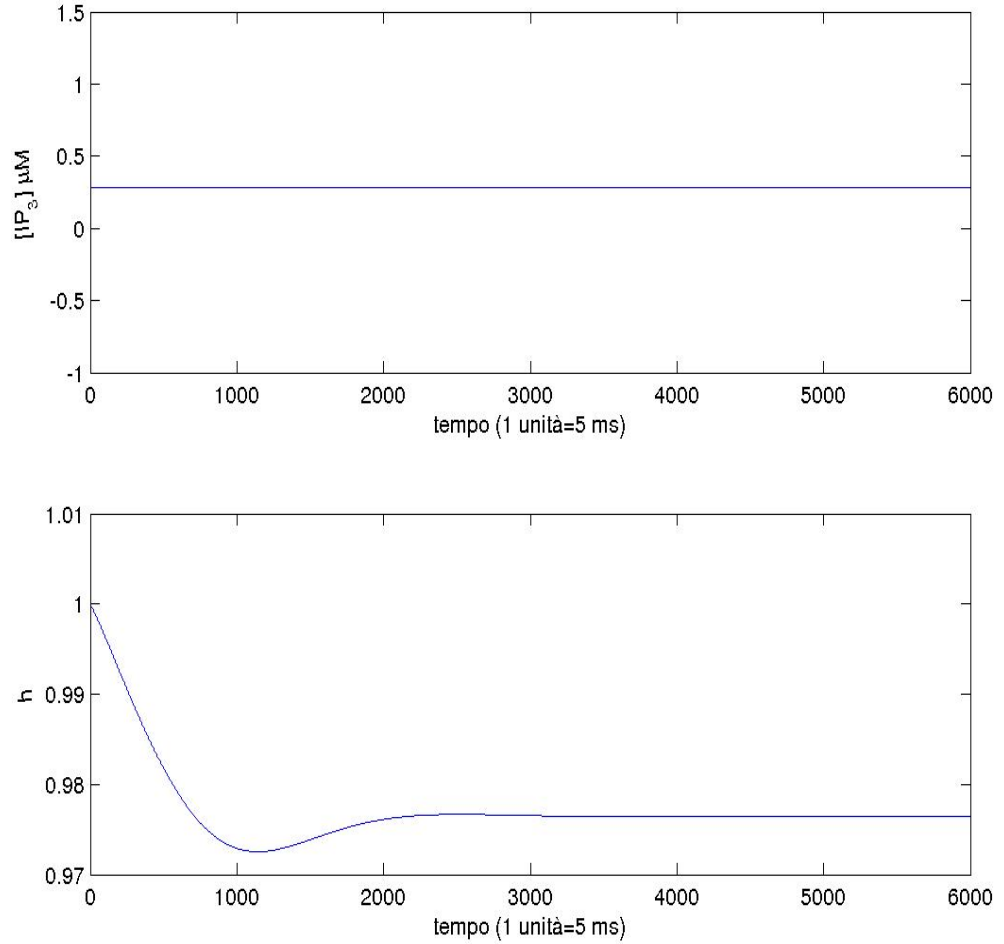


Figura 1.6: (In alto) Partendo dal suo valore di equilibrio la concentrazione di IP_3 è chiaramente costante nel tempo mentre (in basso) la variabile h impiega un tempo di circa 15 secondi ad arrivare al suo valore di equilibrio (pari a $h_{eq} = 0.976 \approx 1$).

1.3.2 Onde concentriche e l'ipotesi di diffusione passiva dell' IP_3

Tutta una serie di studi sperimentali effettuati negli anni passati ha suffragato l'ipotesi (ormai diffusa nella comunità scientifica) che onde intercellulari di calcio ottenute tramite stimolazione meccanica siano originate dalla diffusione, attraverso le gap junction, dell' IP_3 (vedi [12]).

Secondo questa ipotesi l' IP_3 viene inizialmente prodotto in una singola cellula in risposta ad uno stimolo meccanico. Successivamente a questo rilascio l' IP_3 si lega ai suoi recettori posti sul reticolo endoplasmatico, attivando il rilascio del calcio contenuto negli store endoplasmatici nel citoplasma (come detto in precedenza, all'equilibrio, la concentrazione di calcio nel reticolo endoplasmatico è maggiore rispetto alla concentrazione del calcio citoplasmatico). Ha così inizio il processo autocatalitico di cui abbiamo parlato nella sezione (1.1). La successiva diffusione dell' IP_3 attraverso le gap-junction permette che lo stesso processo si ripeta nelle cellule vicine a quella che ha subito lo stimolo, ovvero che si generi un'onda intercellulare di calcio (vedi sempre lo schema di figura 1.4).

Bisogna sottolineare che l'ipotesi sopra citata non rende conto di tutte le onde di calcio che sono state osservate in agglomerati cellulari (e, in particolar modo, negli astrociti). Per esempio le onde intercellulari osservate nei lobuli del fegato (vedi [13], [14]) o in preparazioni del tessuto dell'ippocampo (vedi [15]) si propagano per grandi distanze, e non possono essere originate dalla diffusione passiva di un singolo messaggero. Per la propagazione di onde a lungo range deve esistere un meccanismo di autorigenerazione dell'onda, e si suppone che questo sia ottenuto tramite il rilascio di un messaggero extracellulare. Nella nostra trattazione considereremo solo onde originate dalla diffusione passiva dell' IP_3 , ovvero onde a corto range.

Per capire se il modello di *Atri* permette la propagazione di onde all'interno di un agglomerato di astrociti, consideriamo una matrice 20×20 di astrociti e stimoliamo meccanicamente la cellula centrale (vedi figura 1.7). Accettata l'ipotesi citata pocanzi, questo corrisponde ad aggiungere una quantità di IP_3 nella cellula centrale tanto più grande quanto più grande è lo stimolo meccanico (chiaramente non si può superare un certo valore di "rottura").

Tutte le variabili, inizialmente, sono regolate al loro valore di equilibrio, ma nel punto centrale della matrice (indicato in figura (1.7)) aggiungiamo $3.2 \mu M$ di IP_3 . Simuliamo quaranta secondi di attività e ogni cinque secondi registriamo la concentrazione di Ca^{2+} nella matrice. Di tale concentrazione abbiamo poi realizzato i corrispondenti density plot tramite il programma *MATLAB*, tali plot sono riportati in figura (1.8).

Come è possibile vedere dalla figura (1.8) il modello propaga un'onda

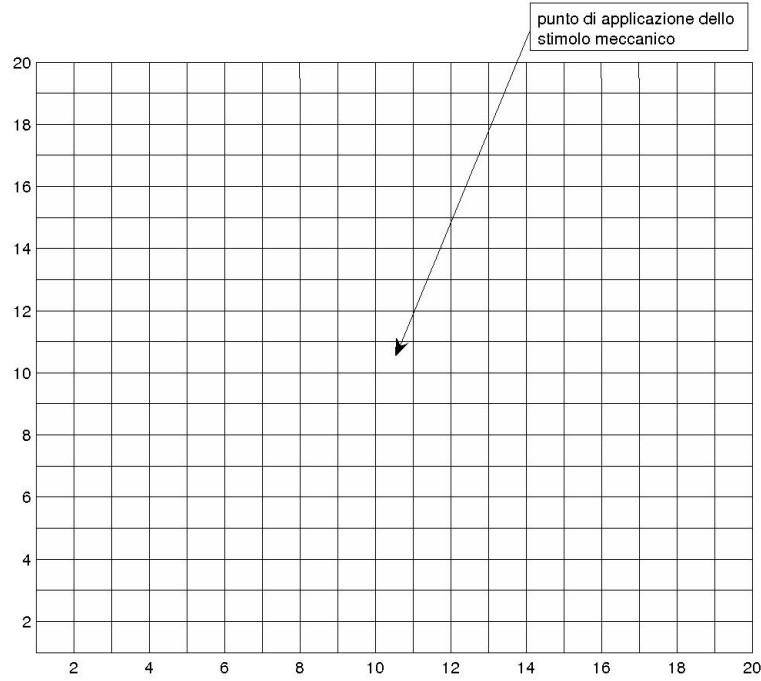


Figura 1.7: Schema della matrice di astrociti utilizzata per la simulazione. Ogni quadrato rappresenta un astrocita; ogni astrocita è stato suddiviso in una matrice quadrata di 5×5 punti.

concentrica che va diminuendo di intensità man mano che si espande, fino a svanire completamente. L'onda ha quindi un range di azione finito, naturalmente tale range aumenta all'aumentare della quantità di IP_3 che viene aggiunta nella cellula centrale, ovvero all'aumentare dell'intensità dello stimolo meccanico.

Per avere una visione quantitativa di quanto detto abbiamo plottato in figura (1.9) la concentrazione di Ca^{2+} (espressa sempre in micromoli) lungo una linea che attraversa la matrice di astrociti al centro. Da questo plot è possibile vedere che l'onda si divide in due fronti, alti inizialmente circa una micromole ciascuno, per poi scendere in altezza via via che l'onda si muove e, quindi, via via che aumenta il raggio dell'onda stessa. Dai plot di figura (1.9) si può inoltre ricavare facilmente la velocità media a cui si propaga l'onda. Tra l'istante $t = 5\text{ s}$ e $t = 10\text{ s}$ l'onda viaggia con una velocità media di circa $4,8\text{ }\mu\text{m/s}$, tra $t = 30\text{ s}$ e $t = 35\text{ s}$ la velocità media si dimezza a $2,2\text{ }\mu\text{m/s}$, entrambi i valori sono in buon accordo con i dati sperimentali (vedi [3]), e dimostrano che il mezzo introduce un'attrito.

Riassumendo, il modello di *Atri*:

- permette la propagazione di onde concentriche con range finito
- il range delle onde è tanto più grande quanto più grande è lo stimolo che le ha prodotte
- il mezzo che propaga le onde è dissipativo, ovvero è presente un attrito

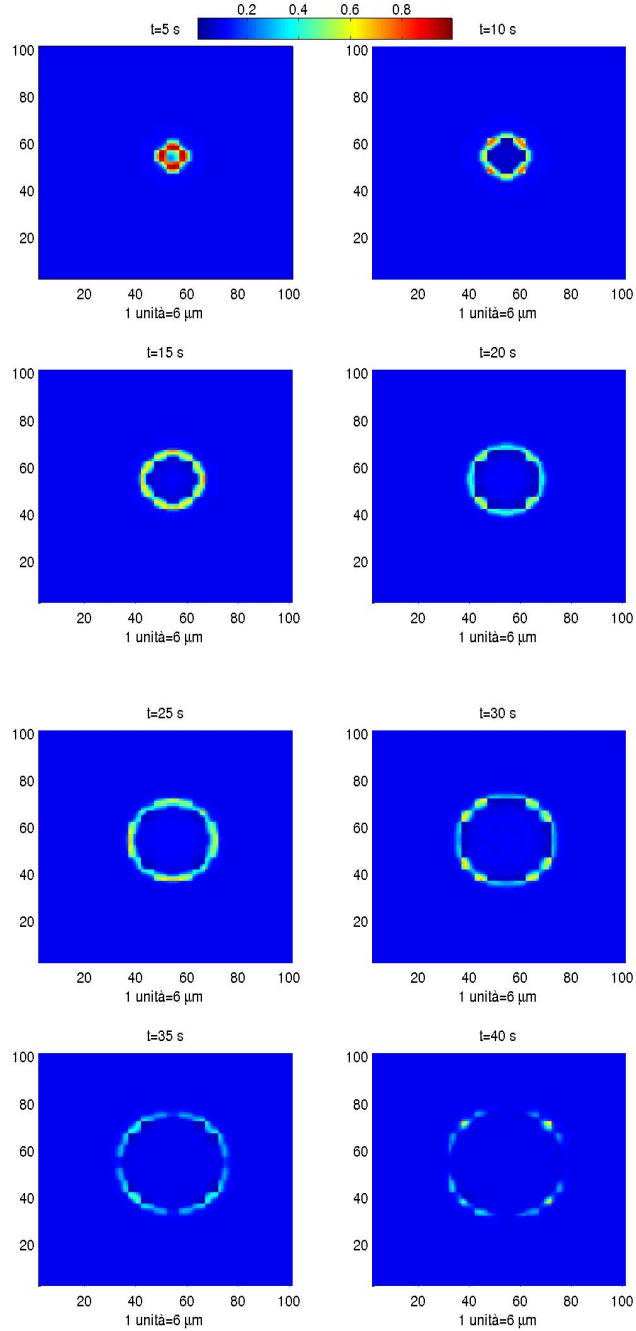


Figura 1.8: Density plot della concentrazione di Ca^{2+} al variare del tempo in una matrice di 20×20 astroцитi in cui all'istante $t = 0$ sono state aggiunte $3.2 \mu M$ di IP_3 nella cellula centrale. In alto riportiamo la scala di colori espressa in μM . Le zone rosse sono quelle a maggior concentrazione di calcio, quelle blu sono zone in cui il calcio è all'equilibrio. Ogni astrocyta è un quadrato di $30 \times 30 (\mu m)^2$ ed è stato suddiviso in una griglia di 5×5 punti, ottenendo così una matrice di 100×100 punti e un passo spaziale pari a $dx = 30 \mu m / 5 = 6 \mu m$. Un unità di misura spaziale lungo l'asse x o l'ungo l'asse y corrisponde quindi a $6 \mu m$

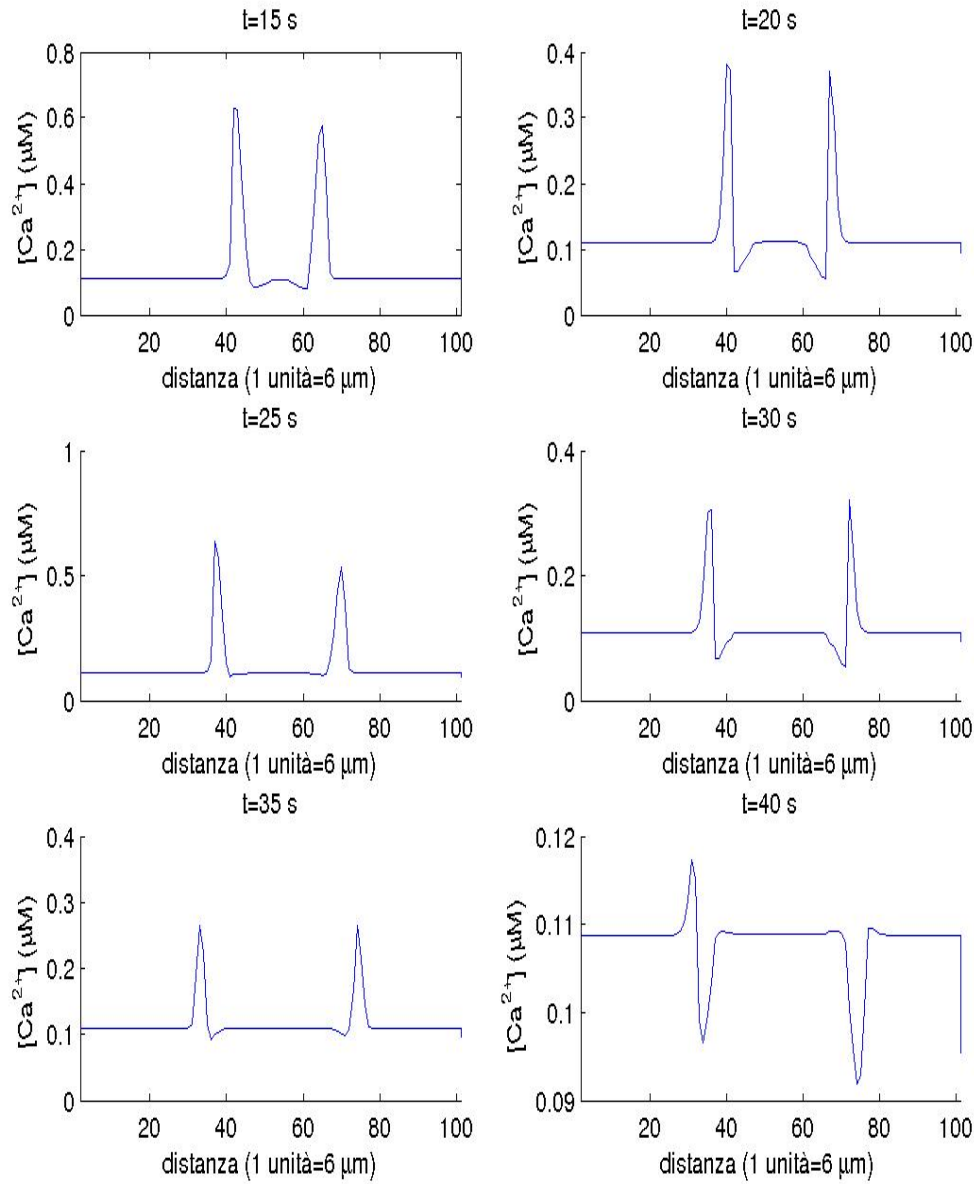


Figura 1.9: Concentrazione di Ca^{2+} espressa in micromoli lungo la linea che attraversa al centro la matrice. Col progredire lungo la matrice il fronte d'onda si abbassa e al tempo $t = 40 s$ è ridotto ad un fronte d'onda negativo (ovvero al di sotto della concentrazione di equilibrio pari a $0.108 \mu M$).

1.3.3 Onde di calcio a spirale

Esiste un gran numero di osservazioni sperimentali di onde di calcio a forma di spirale in colture di astrociti e anche di altri tipi di cellule (ad esempio gli oociti dello *Xenopus Laevis*). In figura (1.10) riportiamo l'osservazione di un'onda a spirale in una cultura di cellule dell'ippocampo. L'immagine è ottenuta tramite tecniche di imaging ed è tratta da ([7]).

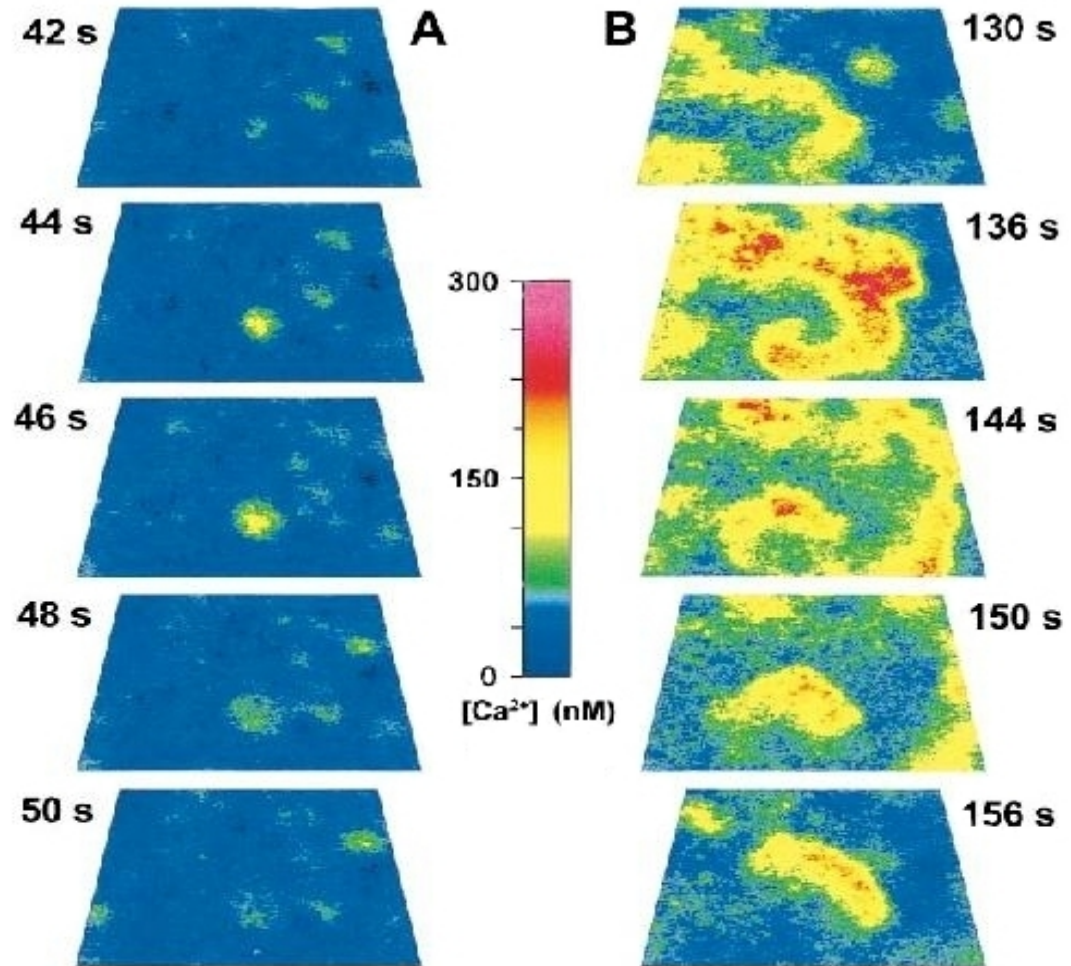


Figura 1.10: Generazione di onde di calcio in una coltura di cellule dell'ippocampo. A: emissioni spontanee di calcio da parte delle cellule della coltura. B: la stessa coltura 10 s secondi dopo l'applicazione di un bagno di $20 \mu M$ di NMDA (N-methyl-D-aspartate). Si nota la formazione di un'onda a spirale che coinvolge un gran numero di cellule della coltura.

Vedremo ora che il modello che stiamo usando per gli astrociti riesce a

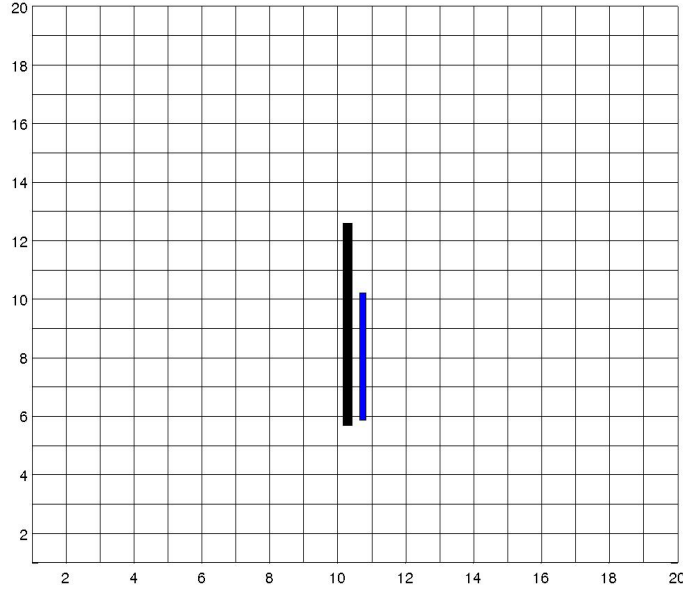


Figura 1.11: Schema del metodo utilizzato per la generazione di onde a spirale in una matrice di astrociti 20×20 . In nero è indicata la zona in cui vengono aggiunte ogni secondo, per i primi otto secondi della simulazione, $0.8 \mu M$ di IP_3 . In blu è indicata la zona in cui l' IP_3 è tenuto fisso al suo valore di equilibrio per i primi sei secondi della simulazione.

riprodurre onde di calcio con fronti a spirale. In figura (1.11) è rappresentata la matrice di astrociti utilizzata per la simulazione; in nero è indicata la zona in cui, all'istante $t = 0$, viene aggiunto l' IP_3 . In assenza di altri accorgimenti il bolo di IP_3 che è stato aggiunto genera un'onda di calcio con forma ellittica. Per generare un'onda a spirale è necessario aggiungere un "ostacolo" alla propagazione dell' IP_3 che permetta al fronte d'onda di piegarsi su se stesso. La linea blu in figura (1.11) indica la posizione dell'ostacolo, ovvero una zona in cui l' IP_3 è tenuto al suo valore di equilibrio per un tempo abbastanza grande da permettere al fronte di ripiegarsi³. In figura (1.12) sono mostrati i density plot della concentrazione di calcio a vari istanti.

³L'ostacolo viene rimosso all'istante $t = 6 s$.

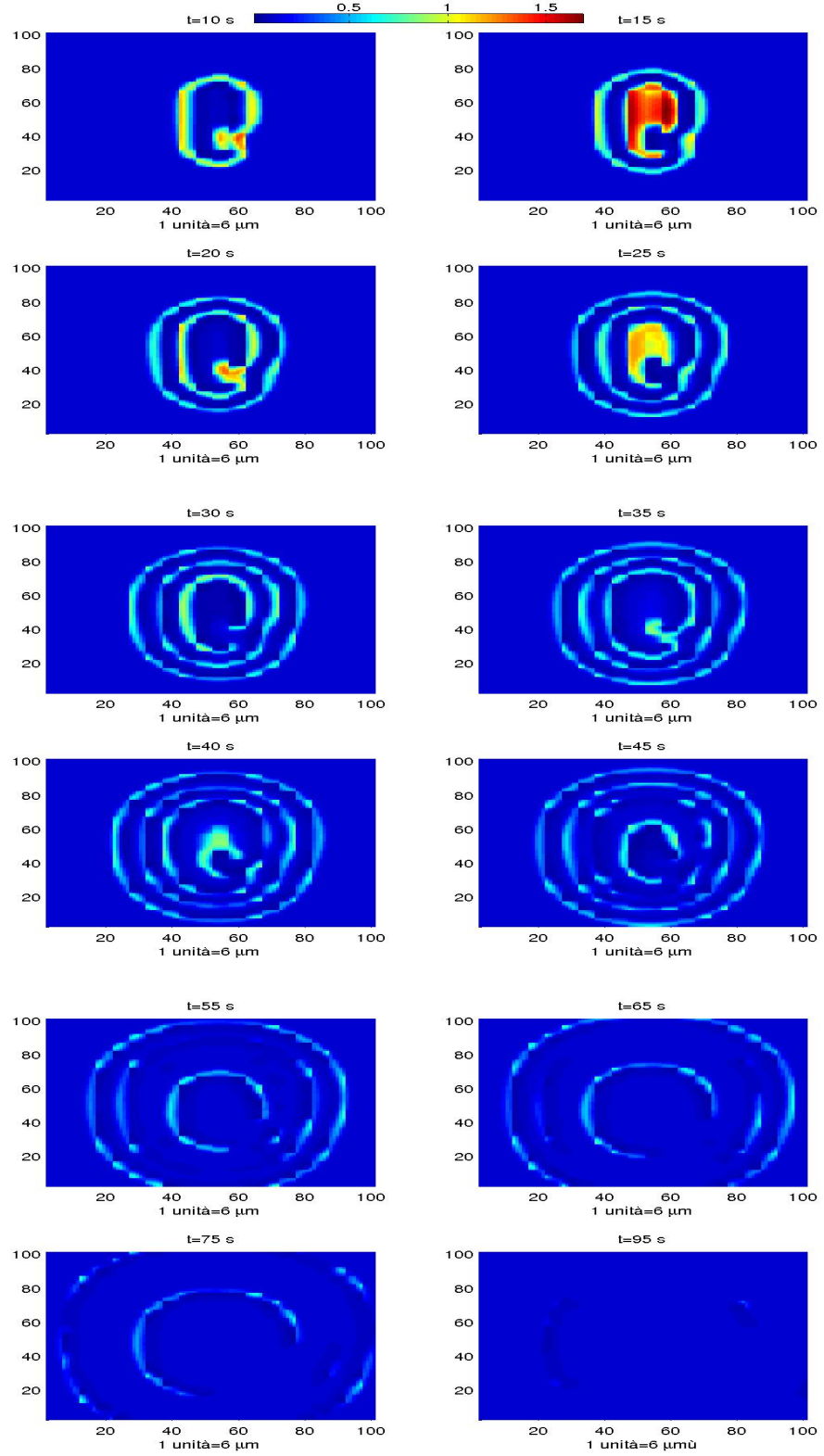


Figura 1.12: Formazione di un'onda a spirale in una matrice di astrociti. La matrice è la stessa utilizzata per le onde concentriche. A $t = 20\text{ s}$ è già visibile la formazione della spirale che è completa a $t = 35\text{ s}$ e a $t = 40\text{ s}$. La spirale degenera infine in un'onda concentrica ($t = 55\text{ s}$).

Capitolo 2

Il modello di Izhikevich

Per poter simulare una rete neuro-gliale è necessario scegliere quale modello utilizzare per i neuroni della rete.

Anche per i neuroni si possono sviluppare svariati modelli. Nel caso in cui si voglia simulare una vasta rete di neuroni è necessario trovare un compromesso tra due aspetti mutualmente escludenti: 1) il modello deve essere computazionalmente semplice per permettere in tempi ragionevoli di simulare un grande numero di neuroni 2) deve riprodurre in modo più verosimile possibile i comportamenti osservati sperimentalmente. Esistono modelli molto accurati per quanto riguarda la verosimiglianza biologica (modelli alla Hodgkin-Huxley), ma che sono proibitivi da un punto di vista computazionale, specialmente per il loro utilizzo in reti neurali estese. In alternativa esistono modelli detti integrate-and-fire molto economici dal punto di vista computazionale, ma troppo poco verosimili, non essendo in grado di riprodurre molti degli aspetti dinamici del comportamento dei neuroni. Izhikevich ha proposto un modello di neurone biologicamente verosimile come i modelli Hodgkin-Huxley ma computazionalmente economico come un integrate-and-fire. Il modello prevede due variabili e quattro parametri e riproduce i comportamenti di spiking e bursting osservati nei neuroni della corteccia celebrale. In figura (2.1) mostriamo il confronto tra alcune registrazioni del potenziale di membrana di un neurone della corteccia motoria di un topo e i comportamenti corrispondenti che il modello riesce a riprodurre (l'immagine è tratta da [18]).

Per le nostre simulazioni utilizziamo una forma semplificata del modello realizzata apposta per le simulazioni di reti estese.

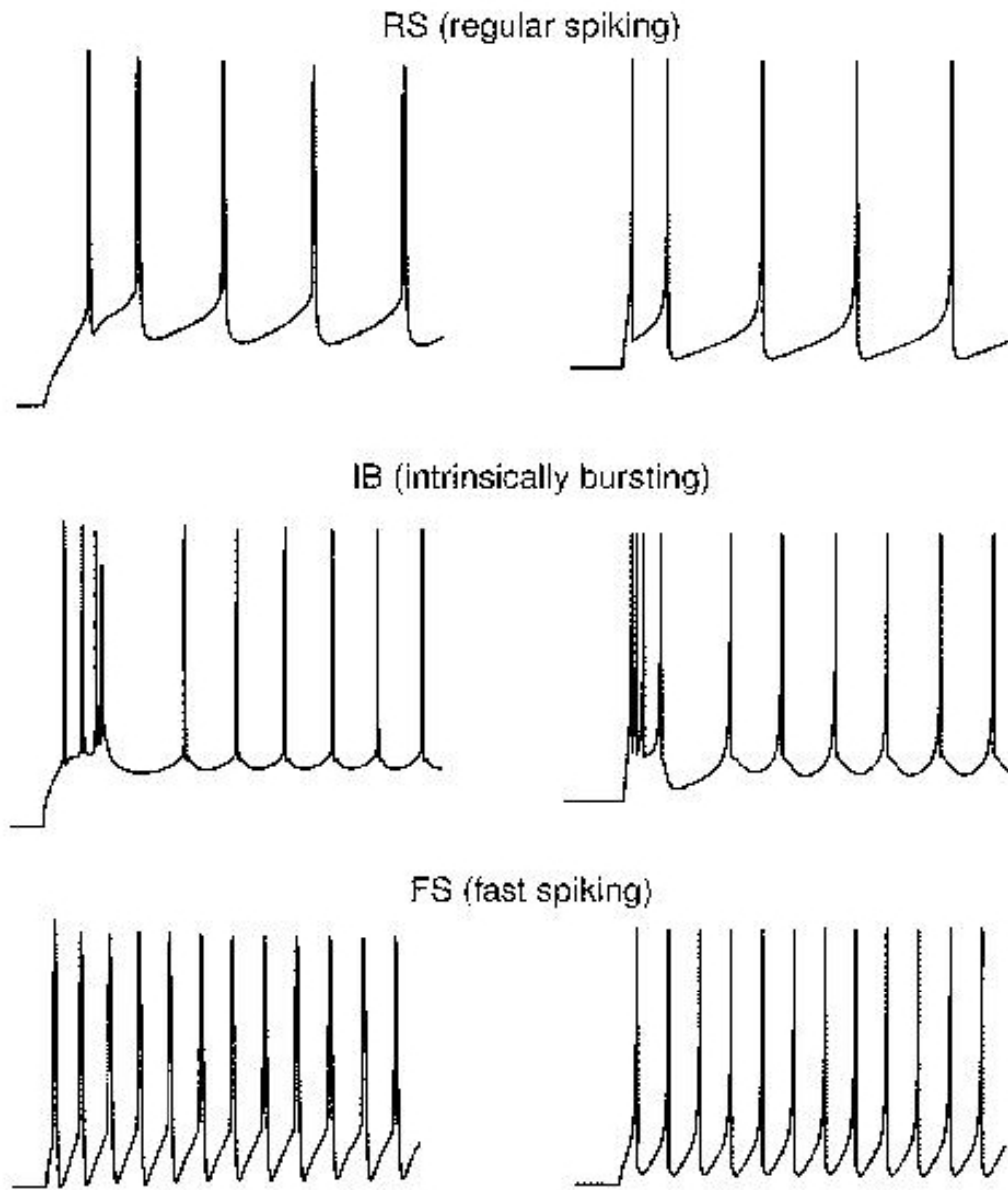


Figura 2.1: (A sinistra) Registrazioni del potenziale di membrana di un neurone della corteccia motoria di un topo. (A destra) I corrispondenti comportamenti che il modello di Izhikevich (equazioni (2.1),(2.2)) riesce a riprodurre.

2.1 Le equazioni del modello di Izhikevich

Le equazioni del modello sono le seguenti:

$$\frac{dv}{dt} = 0.04v^2 + 5v + 140 - u + I \quad (2.1)$$

$$\frac{du}{dt} = a(bv - u) \quad (2.2)$$

Con le condizioni ausiliarie di reset dopo uno spike:

$$\text{se } v \geq 30 \text{ mV} \quad \text{allora} \quad \begin{cases} v \rightarrow c \\ u \rightarrow u + d \end{cases}$$

La variabile v è il potenziale di membrana del neurone mentre u è una variabile di recupero che tiene conto dell'attivazione delle correnti ioniche di K^+ e della inattivazione delle correnti di Na^+ , realizza inoltre un feedback negativo sulla variabile v . Quando avviene uno spike (ovvero v supera il valore di soglia di 30 mV) il potenziale di membrana viene riportato al suo valore di reset c mentre la variabile u viene aumentata di d .

La variabile I tiene invece conto delle correnti sinaptiche e di eventuali input esterni (ad esempio, nelle simulazioni delle reti neuro-gliali, le correnti che gli astrociti iniettano nei neuroni vengono direttamente inserite nella variabile I). Il termine $0.04v^2 + 5v + 140$ è stato ottenuto fittando la dinamica dei neuroni della corteccia in modo che la variabile v vari sulla scala dei mV e i tempi sulla scala dei ms ; nel modello (2.1)-(2.2) le variabili v e u e i parametri (a, b, c, d) sono introdotti come quantità adimensionali. Come accade nei neuroni reali nel modello di Izhikevich non esiste un valore di soglia¹ fisso, esso dipende dalla storia del potenziale di membrana v prima dello spike e varia tra -55 mV e -60 mV . Il valore del potenziale di riposo dipende invece dal valore del parametro b e varia tra -70 mV e -60 mV . Gli altri parametri hanno significati diversi che riassumiamo qui di seguito:

- Il parametro a indica il tempo caratteristico della variabile di recupero u , tanto più piccolo è a tanto più lenta è la variabile u . Un valore tipico per il parametro a è 0.02 .
- Il parametro b descrive la sensibilità della variabile di recupero u alle fluttuazioni sottosoglia del potenziale di membrana v . In pratica se b cresce aumenta l'accoppiamento tra u e v e si abbassa il potenziale di soglia. Un valore tipico per il parametro b è 0.2 .

¹Per valore di soglia si intende il valore che deve superare il potenziale di membrana del neurone per emettere un impulso di tensione.

- Il parametro c indica semplicemente il valore che acquisisce immediatamente dopo uno spike il potenziale di membrana v è vale tipicamente $-65 mV$.
- Il parametro d regola il valore post-spike della variabile di recupero. Tipicamente $d = 2$.

Si possono scegliere diversi valori per il set di parametri (a, b, c, d) ottenendo così una vasta gamma di comportamenti osservati sperimentalmente nei neuroni della corteccia celebrale (vedi figura (2.4)).

2.2 Campo delle velocità

Per studiare le proprietà del modello che stiamo utilizzando abbiamo riportato il grafico del campo vettoriale $(f(v, u), g(v, u))$ dove $f(v, u) = 0.04v^2 + 5v + 140 - u$ e $g(v, u) = a(bv - u)$ sono le derivate delle variabili del modello. Il grafico per il caso $(a, b) = (0.1, 0.2)$ è riportato in figura (2.2). Nel grafico riportiamo anche le curve in cui si annullano le funzioni f e g la cui intersezione individua i punti di equilibrio del sistema.

Con l'aumentare del parametro b tale intersezione viene a mancare ed il neurone non ammette più uno stato stabile. Nel capitolo (4) spieghiamo come questo fatto sia importante per trovare una rete neurale che abbia un'attività autonoma. Mostriamo, per completezza, in figura (2.3) lo stesso grafico di figura (2.2) ma nel caso $(a, b) = (0.1, 0.3)$. Avendo aumentato il valore di b le due curve di livello 0 delle funzioni f e g hanno intersezione nulla e il sistema non ammette più punti stabili.

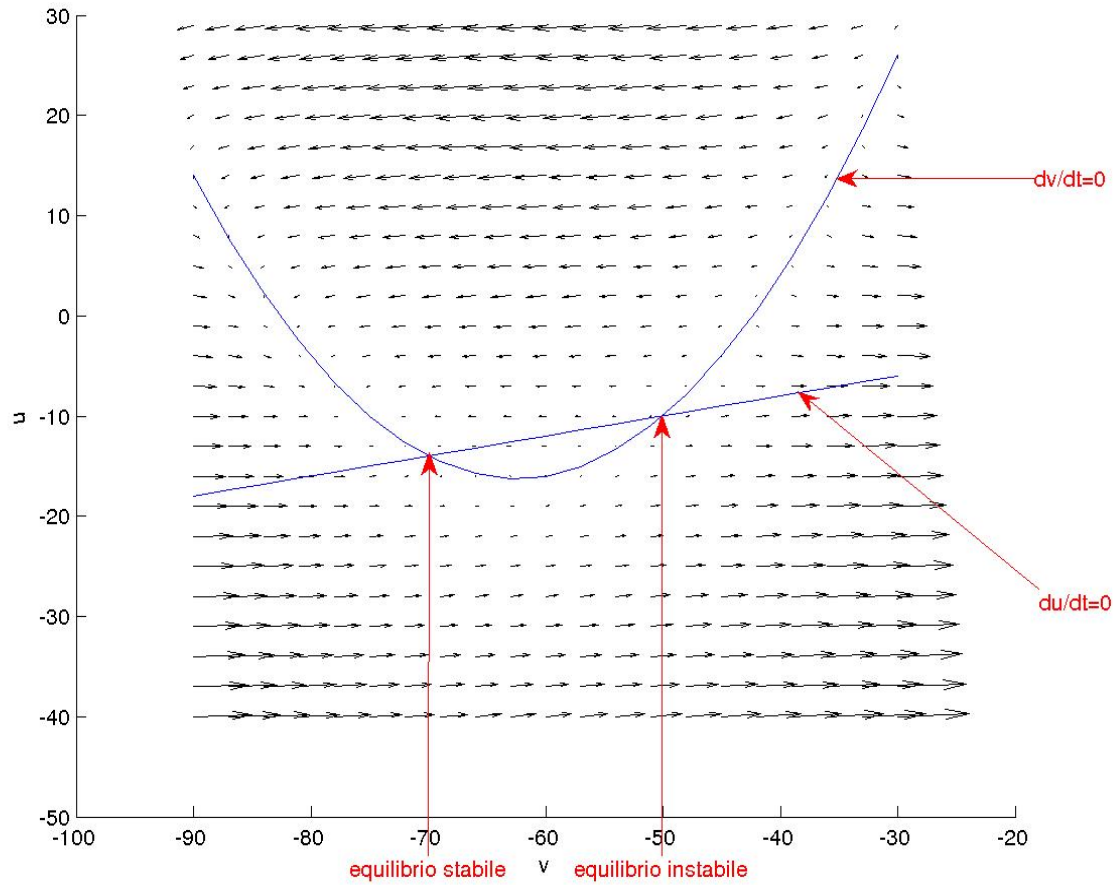


Figura 2.2: Campo delle velocità per il sistema descritto da (2.1)-(2.2) nel caso $(a, b) = (0.1, 0.2)$. Il sistema possiede un punto di equilibrio stabile corrispondente allo stato di riposo del neurone e un punto di equilibrio instabile corrispondente ad uno stato eccitato. In blu sono riportate le curve in cui si annullano le funzioni f e g .

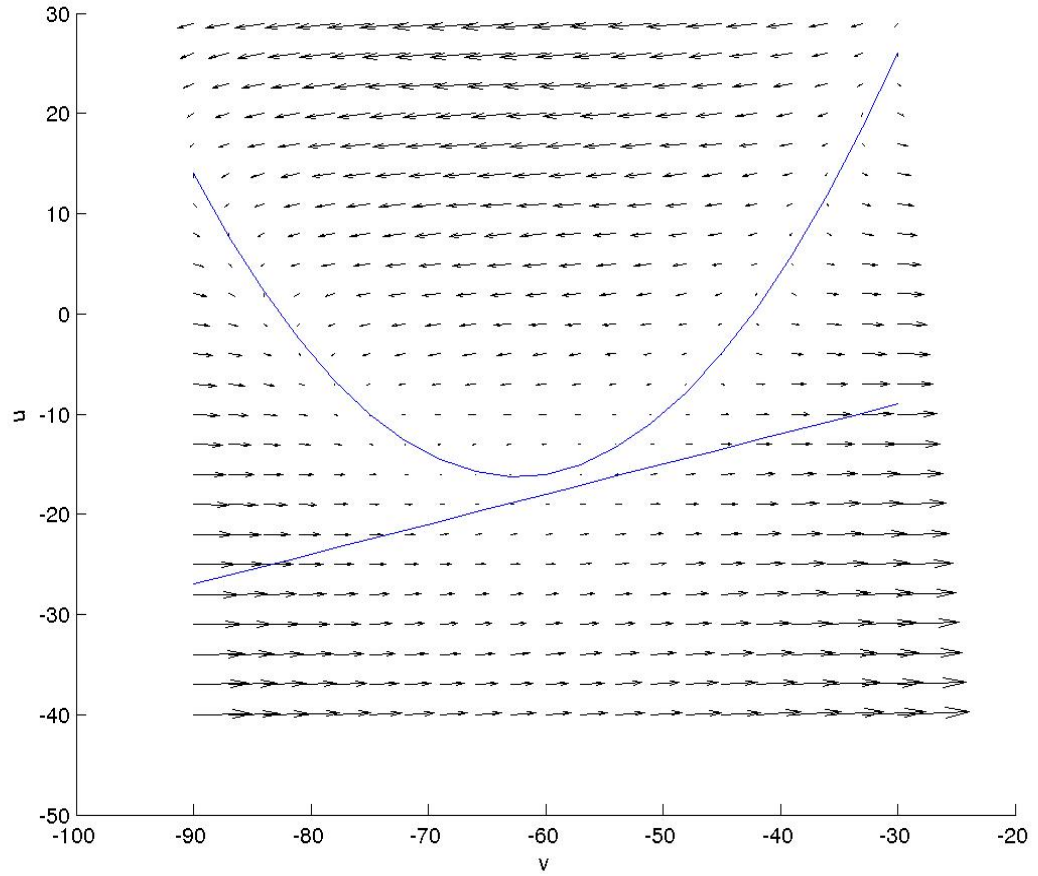


Figura 2.3: Campo delle velocità per il sistema descritto da (2.1)-(2.2) nel caso $(a, b) = (0.1, 0.3)$. Il sistema non possiede punti di equilibrio. In blu sono riportate le curve in cui si annullano le funzioni f e g .

2.3 Dinamica neuronale

Tutti i neuroni (eccitatori ed inibitori) della neocorteccia del cervello dei mammiferi possono essere divisi in diverse classi in base ai pattern di spiking e bursting osservati tramite misurazioni intracellulari. I neuroni eccitatori si dividono in quattro classi:

- Neuroni RS (*regular spiking*). I neuroni RS sono i più comuni nella corteccia celebrale. Quando vengono eccitati da uno stimolo esterno prolungato (ad esempio un corrente di input I a gradino, vedi figura (2.4)) gli RS sparano dapprima alcuni impulsi con un breve intervallo tra un impulso e l'altro e, successivamente, tale intervallo aumenta. Tali neuroni mostrano quindi un comportamento del tipo “adattamento in frequenza”. Aumentando l'intensità della corrente dc iniettata la frequenza di spiking aumenta, anche se non può superare una certa soglia a causa del valore non nullo del tempo di iperpolarizzazione della membrana. Nel modello di Izhikevich un tale comportamento si ottiene per $c = -65\text{ mV}$ (bassi valori del potenziale di reset) e $d = 8$.
- Neuroni IB (*intrinsically bursting*). I neuroni IB eccitati da uno stimolo prolungato (come esempio prendiamo sempre una corrente a gradino) emettono prima un burst di impulsi e, successivamente, impulsi isolati. Nel modello in considerazione questo corrisponde a $c = -55\text{ mV}$ (alti potenziali di reset) e $d = 4$.
- Neuroni CH (*chattering*). I neuroni CH emettono invece burst ripetuti con una frequenza che può arrivare anche fino a 40 Hz . Nel modello questo comportamento corrisponde a $c = -50\text{ mV}$ e $d = 2$.

I neuroni inibitori si dividono principalmente in due classi²:

- Neuroni FS (*fast spiking*). I neuroni FS emettono tipicamente treni di impulsi con una frequenza elevata e senza alcun tipo di adattamento. Nel modello questo comportamento si ottiene per $a = 0.2$ (recupero veloce).
- Neuroni LTS (*low-threshold spiking*). I neuroni LTS possono emettere, così come i neuroni FS, treni di impulsi ma, diversamente da quest'ultimi, presentano un notevole adattamento in frequenza. Gli LTS possiedono inoltre un basso potenziale di soglia, il che si ottiene nel modello prendendo un valore di b pari a circa 0.25.

²I neuroni inibitori sono, in realtà, molto diversificati tra di loro, per un maggior approfondimento si veda [19].

Il modello di Izhievich può riprodurre inoltre il comportamento dei neuroni talamo-corticali. Questi neuroni sono i principali artefici degli input che stimolano l'attività dei neuroni della corteccia celebrale.

- Neuroni TC (*thalamo-cortical*). I neuroni TC hanno due regimi di emissione di impulsi, entrambi raffigurati nella figura (2.4) TC. Quando il neurone è depolarizzato ($v \approx -60 \text{ mV}$) l'emissione di impulsi è regolare (vedi figura 2TC a sinistra), ma se la membrana viene iperpolarizzata ($v \approx -90 \text{ mV}$), ad esempio da un gradino negativo di corrente, il neurone emette un burst di impulsi (vedi figura (2.4) TC a destra).

Tutti i comportamenti che abbiamo appena citato sono riportati in figura (2.4).

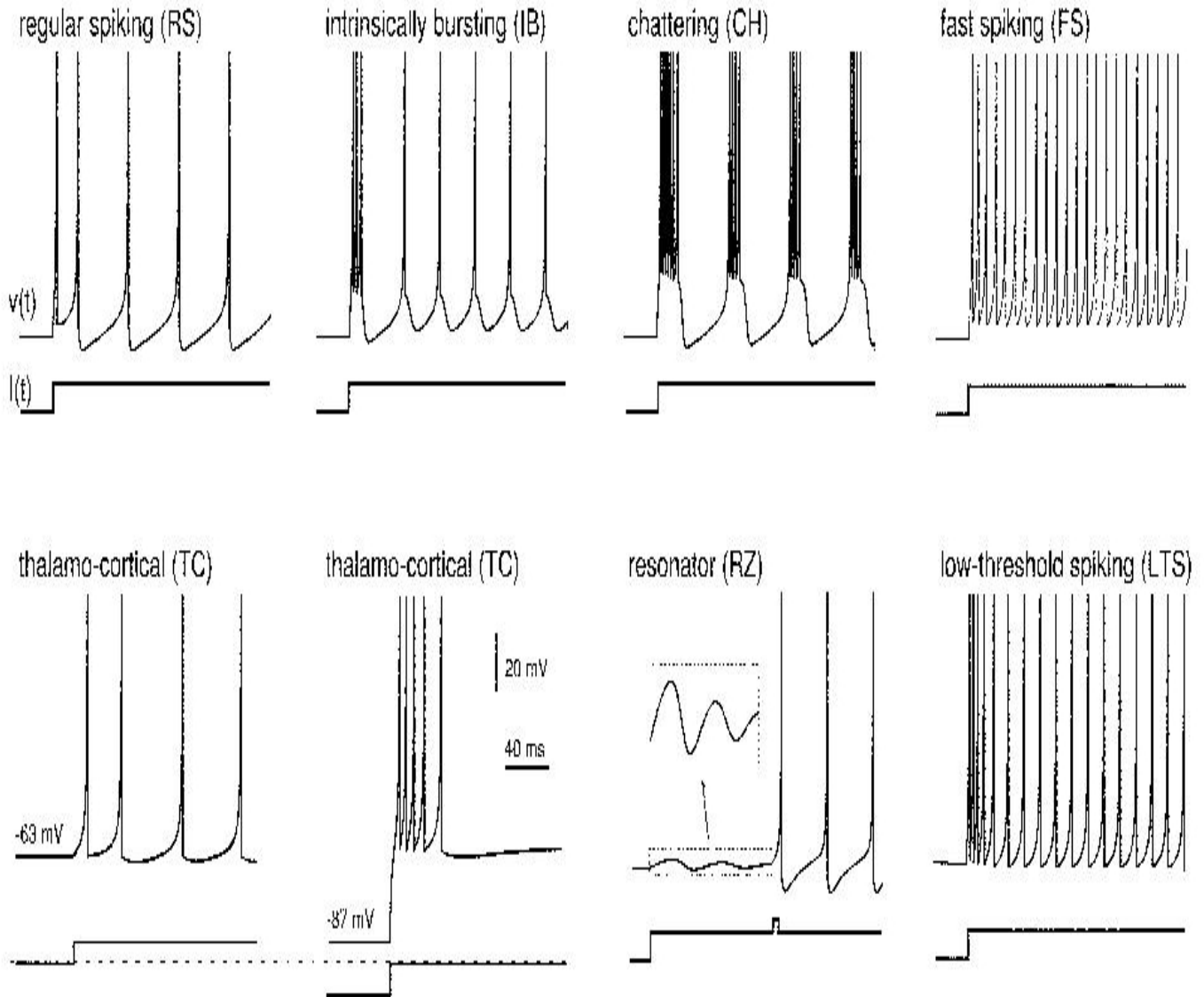


Figura 2.4: Comportamenti riprodotti dal modello (2.1)-(2.2) al variare dei parametri (a, b, c, d) . Sotto ogni figura è riportato lo stimolo iniettato nel neurone per riprodurre quel particolare comportamento. I neuroni RS, IB e CH sono di tipo eccitatorio (quando emettono uno spike aumentano il potenziale di membrana di tutti i neuroni con cui sono connessi), mentre FS e LTS sono inibitori (ovvero quando emettono uno spike diminuiscono il potenziale di membrana di tutti i neuroni con cui sono connessi). L'immagine è tratta da ([18]).

Capitolo 3

Simulazione di una rete neuro gliale

Una rete neuro gliale si ottiene sovrapponendo ad una matrice di astrociti una matrice di neuroni. In figura (3.1) è rappresentata schematicamente il tipo di rete neuro-gliale utilizzato in questo lavoro di tesi. A parità di modelli teorici usati, la complessità della rete dipende dal numero di elementi che la compongono (numero di astrociti e numero di neuroni nel nostro caso). Nelle varie aree del cervello umano il numero di astrociti per neurone varia da tre a dieci (verificare e mettere referenza), vedremo che tale rapporto caratterizza il tipo di onde di calcio che attraversano all’equilibrio la matrice di astrociti.

3.1 Il ruolo degli astrociti e l’interazione astro-cita-neurone

Fino a qualche anno fa si credeva che il ruolo di tutte le cellule gliali fosse quello di fornire un supporto trofico ai neuroni, e che esse non avessero alcun ruolo nel processo di elaborazione dell’informazione all’interno del cervello. Ma negli ultimi anni ricerche sperimentali sugli astrociti hanno messo in evidenza che queste cellule “ascoltano” le comunicazioni tra i neuroni, reagiscono a tali comunicazioni e ne modulano l’attività (vedi ([10]) e ([11])).

Una svolta fondamentale in questa direzione è avvenuta nel 1996 grazie a Porter e McCarthy. Le loro ricerche hanno rivelato che gli astrociti possiedono dei recettori metabotropici di glutammato, il principale neurotrasmettitore. Quando infatti un neurone lancia un impulso di tensione verso un altro, nella sinapsi che li collega avviene un rilascio di alcune sostanze dette neurotrasmettitori. La possibilità da parte degli astrociti di reagire al glutammato legandolo ai loro recettori permette quindi ad essi di reagire

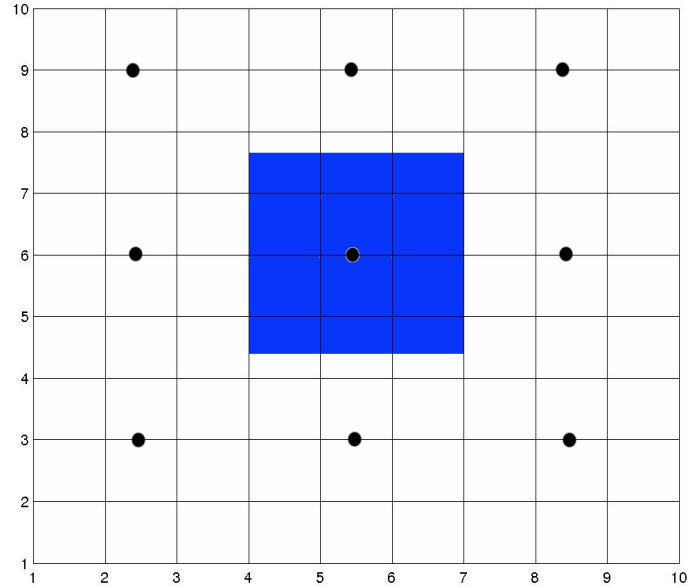


Figura 3.1: Schema di una rete-tipo neuro-gliale utilizzata per le simulazioni. I quadrati bianchi sono gli astrociti (in questo caso sono una matrice 10×10) mentre i punti neri sono i neuroni. Il numero degli astrociti è sempre circa 10 volte maggiore di quello dei neuroni. I neuroni vengono disposti in modo random su una matrice regolare sovrapposta a quella degli astrociti. Ad ogni neurone è associato un dominio di circa 3×3 astrociti (regione blu al centro della figura) che viene utilizzato per mediare la concentrazione di calcio astrocitario attorno al neurone. Tale concentrazione media serve per calcolare la corrente che gli astrociti iniettano nel neurone (vedi dopo).

re alle comunicazioni tra neuroni. Inoltre, quando il glutammato si lega ai suoi recettori, all'interno dell'astrocita avviene il rilascio di un particolare fosfolipide chiamato inositol-1, 4, 5-trifosfato o IP_3 . L' IP_3 a sua volta si lega ai suoi recettori posti sul reticolo endoplasmatico (ER), stimolando così il rilascio del Ca^{2+} endoplasmatico nel citoplasma. All'interno dell'astrocita si genera dunque il processo CICR di cui abbiamo parlato nelle sezioni precedenti. E' quindi possibile che in conseguenza di una comunicazione neuronale si innesci un'onda di calcio nella matrice di astrociti. L'attività neuronale influenza quindi l'attività delle onde calcio negli astrociti.

Anche gli astrociti, a loro volta, influenzano l'attività neuronale, inibendo o eccitando i neuroni. In letteratura non si trovano però, purtroppo, studi quantitativi sull'interazione tra astrociti e neuroni. Gli unici dati che siamo riusciti a trovare a riguardo si trovano in [16]. Si tratta di dati sperimentali ottenuti con un singolo neurone cresciuto su una microisola di astrociti. Tramite tecniche di fluorescenza si misura la concentrazione di calcio media nella microisola e in corrispondenza di questa concentrazione si misura la corrente totale che gli astrociti iniettano nel neurone. I dati così ottenuti vengono fittati ottenendo per la corrente iniettata l'espressione:

$$I_{astro} = 2.11 \theta (\ln z) \ln z \quad (3.1)$$

$$z = [Ca^{2+}] - 196 \quad (3.2)$$

La (3.1) è in realtà la corrente convertita in densità di corrente assumendo il neurone sferico ed è misurata in $\mu A cm^{-2}$. Essa viene poi convertita in $\mu A/\mu F$ dividendo per la densità di capacità del neurone $C_m \approx 3 \mu F cm^{-2}$; la concentrazione di calcio nella (3.1) è espressa invece in nanomoli. La presenza della funzione di Heaviside nella (3.1) implica che la corrente iniettata è sempre positiva, ovvero usando questi dati possiamo simulare solo un'azione eccitatoria degli astrociti nei confronti dei neuroni. La I_{astro} è inoltre nulla se $[Ca^{2+}] \leq 0.196 \mu M$. Come si è visto nella sezione (1.3.1) il valore di equilibrio per il calcio nel nostro modello di astrocita è $0.108 \mu M$. Quindi l'interazione (3.1) è tale che se la concentrazione media di calcio attorno ad un neurone è leggermente superiore alla concentrazione di equilibrio in esso viene iniettata una corrente positiva dagli astrociti ad esso vicini. Se invece tale concentrazione è al suo valore di equilibrio o inferiore, nel neurone non viene iniettata nessuna corrente.

3.2 Dinamica della rete neuro gliale

In tutte le simulazioni di reti neuro-gliali eseguite in questo lavoro di tesi si è scelto il modello di Izhikevich per i neuroni e quello di Atri et al. per gli astrociti. La dinamica della rete è schematizzabile in pochi punti che riportiamo qui di seguito è che abbiamo sviluppato in parte basandoci sui fatti sperimentali di cui abbiamo parlato in precedenza (processo CICR, presenza di recettori metabotropici di glutammato sugli astrociti, correnti astro-citarie etc.) e, in parte, introducendo delle costanti e dei comportamenti fenomenologici:

- I neuroni vengono stimolati da degli input talamici random, che vengono inseriti nella variabile I . L'intensità di tali input è maggiore per i neuroni eccitatori e minore per quelli inibitori (vedi [18], pg.1571). Per essere più precisi ad ogni passo della simulazione (un millisecondo) ogni neurone eccitatorio subisce uno stimolo che è un numero compreso tra 4 e 6 generato da una distribuzione piatta. Ogni neurone inibitorio subisce invece uno stimolo, sempre generato da una distribuzione piatta, compreso tra 1 e 3. Tali valori generati vengono inseriti nella variabile I della (2.1).
- Se il potenziale di membrana di un neurone supera il valore imposto dalla condizione di reset ($v \geq 30 \text{ mV}$) tale condizione viene istantaneamente applicata al neurone in considerazione. Viene inoltre registrato in una opportuna variabile l'insieme A dei neuroni che hanno verificato tale condizione (e che quindi hanno emesso un impulso di potenziale).
- Le connessioni sinaptiche tra i neuroni sono ottenute mediante una matrice random $S = s_{ij}$ (vedi sempre [18], pg.1571) per cui se il neurone j emette un impulso ($v_j \geq 30 \text{ mV}$) il potenziale del neurone i viene istantaneamente cambiato di una quantità pari a s_{ij} ($v_i \rightarrow v_i + s_{ij}$). Quindi ad ogni step della simulazione (uno step corrisponde ad 1 ms di attività) per ogni neurone i è necessario aggiungere agli input talamici la quantità: $\sum_{j \in A} s_{ij}$.

Il collegamento della dinamica neuronale con quella degli astrociti avviene tramite la possibilità degli astrociti di rilevare il rilascio di neurotrasmettitori in una sinapsi. La dinamica degli astrociti può essere schematizzata come di seguito:

- Ogni qual volta il potenziale di membrana di un neurone supera un valore di soglia V_S vicino a 30 mV nel punto della rete in cui è posizionato

il neurone viene rilasciata una quantità Q_{IP_3} di IP_3 . Entrambi i valori V_S e Q_{IP_3} vengono scelti di volta in volta in modo empirico e caratterizzano il comportamento della rete. Implementare questo passaggio nella rete corrisponde a dire che ogni qual volta un neurone subisca degli stimoli abbastanza forti da avvicinare il suo potenziale di membrana al valore di spike (ovvero il neurone ha superato la soglia per emettere uno spike), nel punto in cui è posto il neurone si è accumulata una quantità sufficiente di glutammato da aprire i canali di IP_3 posti sui recettori metabotropici astrociatri di glutammato. L'apertura di tali canali rilascia nel citoplasma astrocitario una quantità fissa di IP_3 che abbiamo indicato con Q_{IP_3} .

- Ad ogni istante e per ogni neurone viene registrata la concentrazione di calcio media in un intorno del neurone. La dimensione di tale intorno è uguale per tutti i neuroni ed è fissata per tutte le simulazioni effettuate. Si è scelto di fare la media della concentrazione di calcio nell'intorno formato dai primi vicini che circondano il neurone (la zona blu indicata in figura (3.1)). Quindi per ogni neurone (indichiamolo con i) otteniamo un valor medio $\langle [Ca^{2+}] \rangle_i$ che inserito nella (3.1) ci dice quanta densità di corrente viene iniettata dagli astroцитi vicini nel neurone. Tale corrente viene divisa per la densità di capacità del neurone $C_m \approx 3.0 \mu F cm^{-2}$. In questo modo si ottiene una quantità espressa in mV/ms che viene inserita nella variabile I della (2.1). In questo processo viene quindi implementata l'interazione astrocita \rightarrow neurone.

Tutto quanto elencato fino ad ora è riportato schematicamente in figura (3.2).

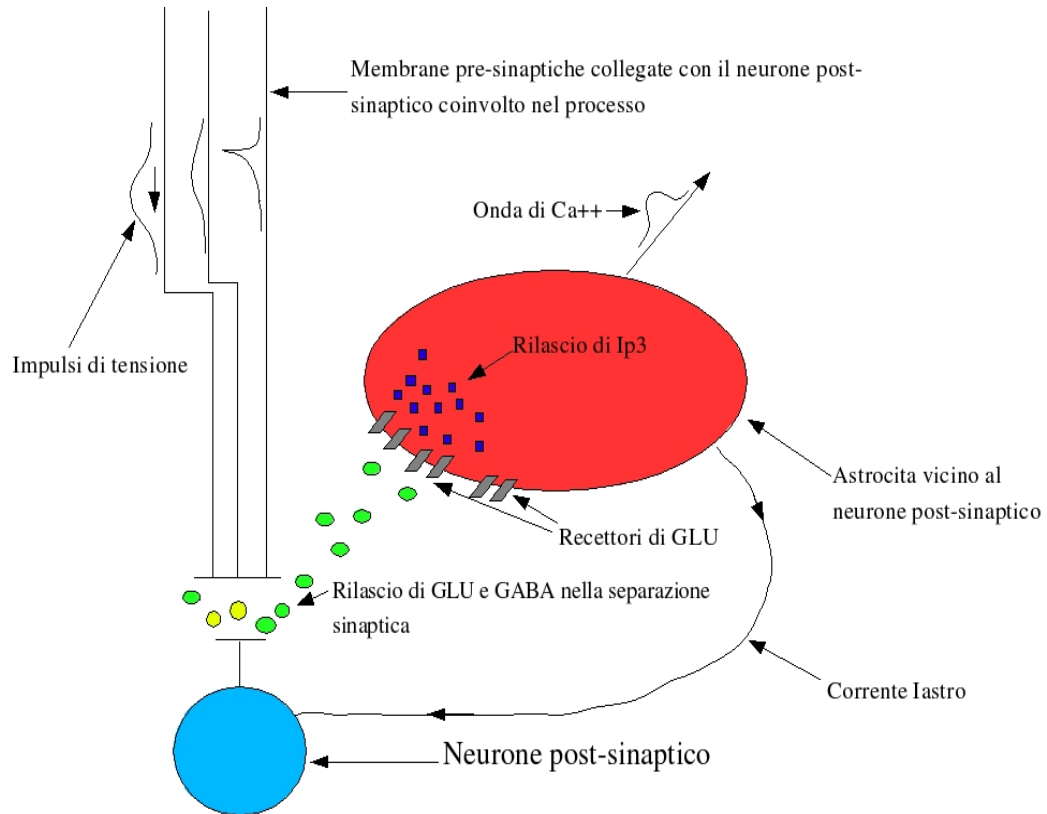


Figura 3.2: Schema che abbiamo creato per il funzionamento della rete neuro-gliale. Sulle membrane sinaptiche viaggiano impulsi di tensione provenienti da vari neuroni sia eccitatori che inibitori. Un impulso proveniente da un neurone eccitatorio rilascia glutammato (GLU, palline verdi) nella separazione sinaptica, uno proveniente da un neurone inibitorio rilascia acido gamma-aminobutirico (GABA, palline gialle). L'accumulo di GLU nella separazione sinaptica fa salire il potenziale del neurone post-sinaptico, mentre l'accumulo di GABA lo fa diminuire. Se il potenziale del neurone post-sinaptico supera il valore di soglia V_S significa che c'è stato un sufficiente rilascio di GLU nella separazione sinaptica tale da aprire i recettori di GLU posti sugli astrociti vicini al neurone post-sinaptico. Il legame del GLU a tali recettori (canali grigi) produce il rilascio di IP_3 nell'astrocita (quadrati blu) attivando in esso il processo CICR e quindi facendo partire un'onda di calcio astrocitaria. Nel neurone viene inoltre iniettata una corrente I_{astro} che è data dall'equazione (3.1) dove come concentrazione di calcio viene presa la concentrazione media attorno al neurone considerato. Ovviamente questo schema viene applicato a tutti i neuroni della rete.

3.3 Risultati delle simulazioni

3.3.1 Rete con 8 astrociti per neurone

Mostriamo di seguito i risultati ottenuti per una rete formata da una matrice di 20×20 astrociti e 7×7 neuroni. In questo caso abbiamo quindi circa otto astrociti per neurone. Le caratteristiche dei neuroni (ovvero il set di parametri (a, b, c, d) del modello di Izhikevich) vengono generate in modo random secondo la ricetta proposta da Izhikevich in ([18]) per ottenere una vasta eterogenità della rete neurale. Precisamente la scelta dei parametri avviene nel seguente modo:

- a vale 0.02 per tutti i neuroni eccitatori ed è pari a $0.02 + 0.08 * r_i$ (con r_i numero casuale compreso tra 0 e 1) per i neuroni inibitori.
- b vale 0.2 per i neuroni eccitatori e $0.25 - 0.05 * r_i$ per i neuroni inibitori.
- c vale $-65 + 15 * r_e^2$ (r_e numero casuale tra 0 e 1) per i neuroni eccitatori e -65 per quelli inibitori.
- d vale $8 - 6 * r_e^2$ per gli eccitatori e 2 per quelli inibitori.

Per rispettare le proporzioni fisiologiche osservate nella corteccia celebrale circa l'ottanta per cento dei neuroni è eccitatorio, mentre il venti per cento è inibitorio. I neuroni vengono poi disposti in modo random su una matrice sovrapposta a quella astrocitaria come in figura (3.1). Abbiamo scelto per Q_{IP_3} un valore pari a $0.009 \mu M$ e per V_S un valore pari a $25 mV$.

Rete con $I_{astro} \neq 0$ Nella prima simulazione effettuata entrambe le interazioni astrocita→neurone e neurone→astrocita erano attive. Abbiamo simulato 500 secondi di attività registrando ogni 5 millisecondi la concentrazione media di calcio nella matrice di astrociti e anche il valor medio (spaziale) della variabile h .

In figura (3.3) riportiamo i density plot della concentrazione di calcio a vari istanti. Si vede che dopo una fase iniziale abbastanza ordinata (vedi figure corrispondenti a $t = 10 s$ e $t = 20 s$) i pattern prodotti dalle onde di calcio sono irregolari.

In figura (3.4) è invece riportata la concentrazione media di calcio nella matrice campionata con una frequenza di un punto ogni cinque millisecondi per ragioni di memoria. Si nota che il calcio medio è soggetto a delle oscillazioni con una frequenza pressochè stabile a $0.06 Hz$. Il valor medio temporale calcolato con i dati prodotti dalla simulazione è di $0.3047 \mu M$.

In figura (3.5) riportiamo invece la traiettoria definita dalle quantità $(c(t), h(t))$ con c e h rispettivamente il calcio medio e la variabile canale media della matrice di astrociti. Otteniamo quindi la traiettoria nello spazio delle fasi “ridotto” degli astrociti. Per ridotto si intende che non riportiamo le variabili di tutti gli astrociti, ma bensì la loro media. Ogni astrocita è individuato però da tre variabili p, c e h (vedi equazioni 1.1-1.5). Tuttavia la variabile p non aggiunge molto alla dinamica del sistema. In figura (3.6) riportiamo l’andamento dell’ IP_3 medio che, come si vede, è praticamente costante a meno di piccole oscillazioni. Ecco perchè è sufficiente usare un plot bidimensionale con le variabili c e h piuttosto che uno tridimensionale con p, c e h .

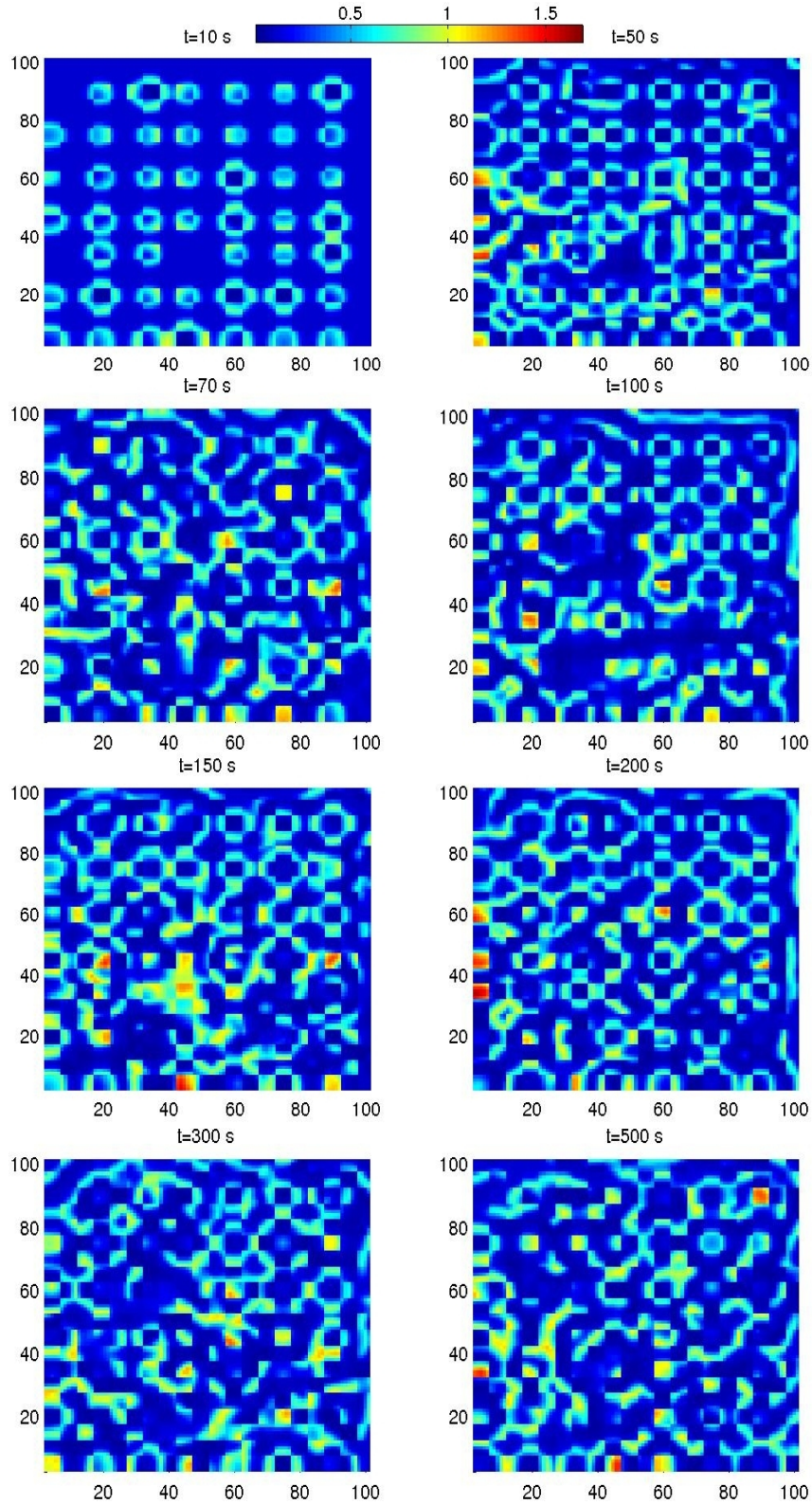


Figura 3.3: Density plot della concentrazione del calcio nella matrice di astrociti. L'unità di misura spaziale è $6 \mu m$ come nelle simulazioni precedenti (ogni astrocita è stato diviso in una matrice 5×5). La barra dei colori in alto indica la concentrazione di Ca^{2+} espressa in micromoli.

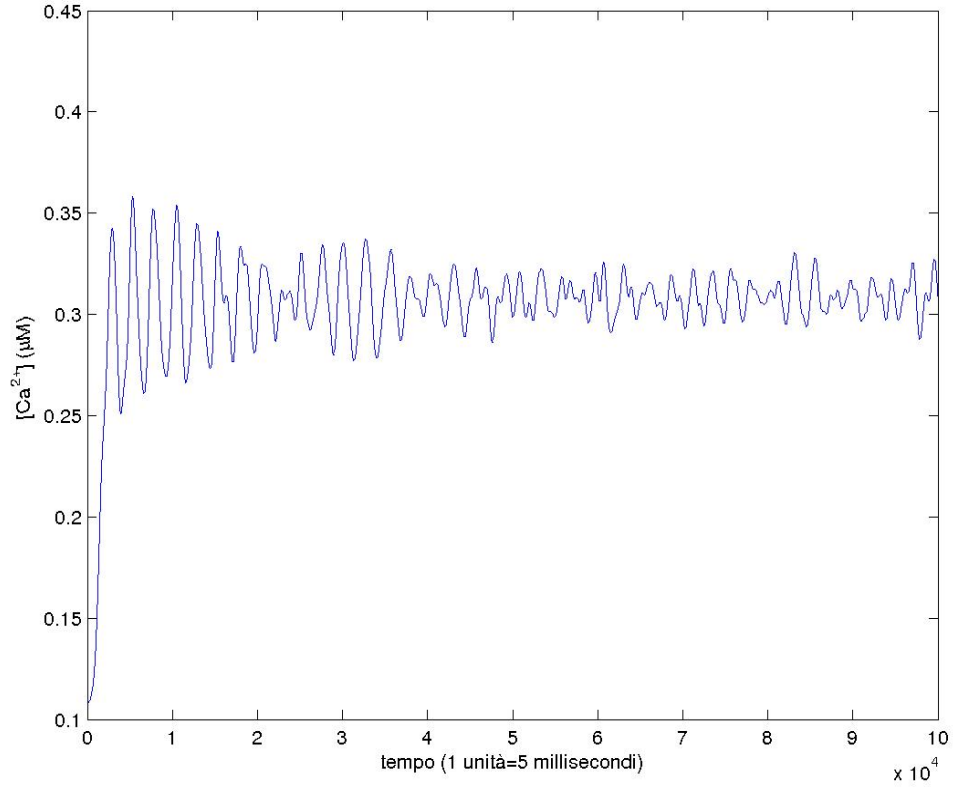


Figura 3.4: Andamento temporale della quantità di calcio medio della matrice di astrociti. Sono stati simulati 500 secondi di attività ma, per poter meglio trattare i dati, il calcio medio è stato campionato con una frequenza di un punto ogni cinque millisecondi. Il calcio medio oscilla con una frequenza di 0.06 Hz attorno ad un valore medio di $0.3047\text{ }\mu M$.

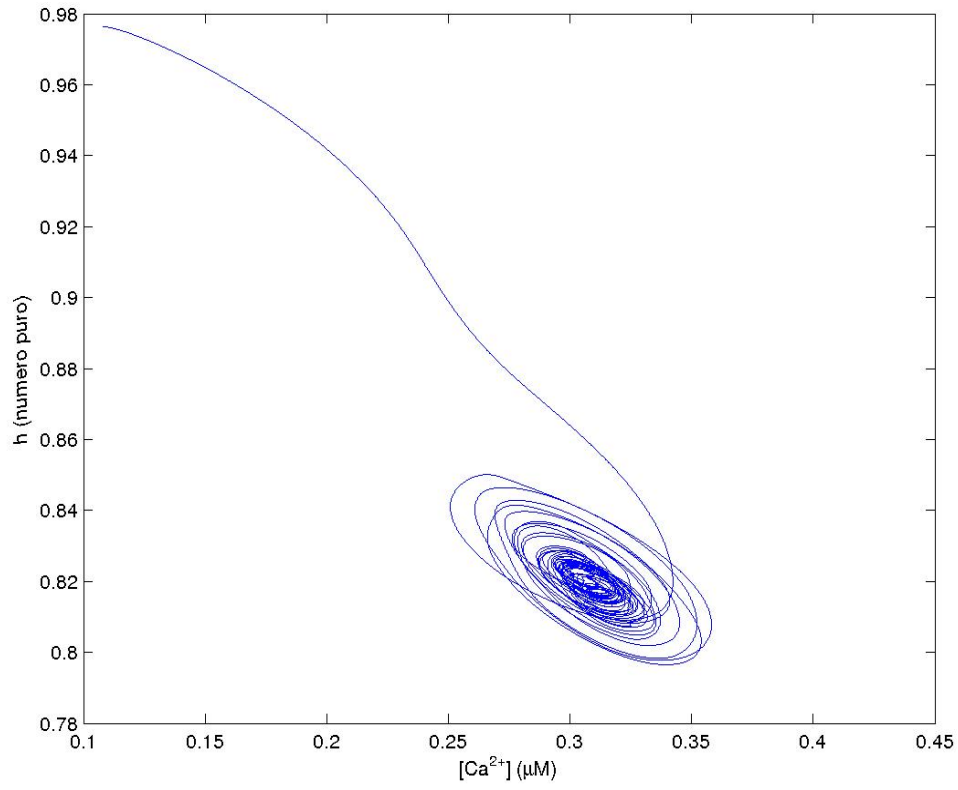


Figura 3.5: Traiettorie nello spazio $h - c$ per le variabili h e c mediate su tutta la matrice di astrociti (caso $I_{astro} \neq 0$). Il sistema viene attratto su un'orbita limitata ma non chiusa.

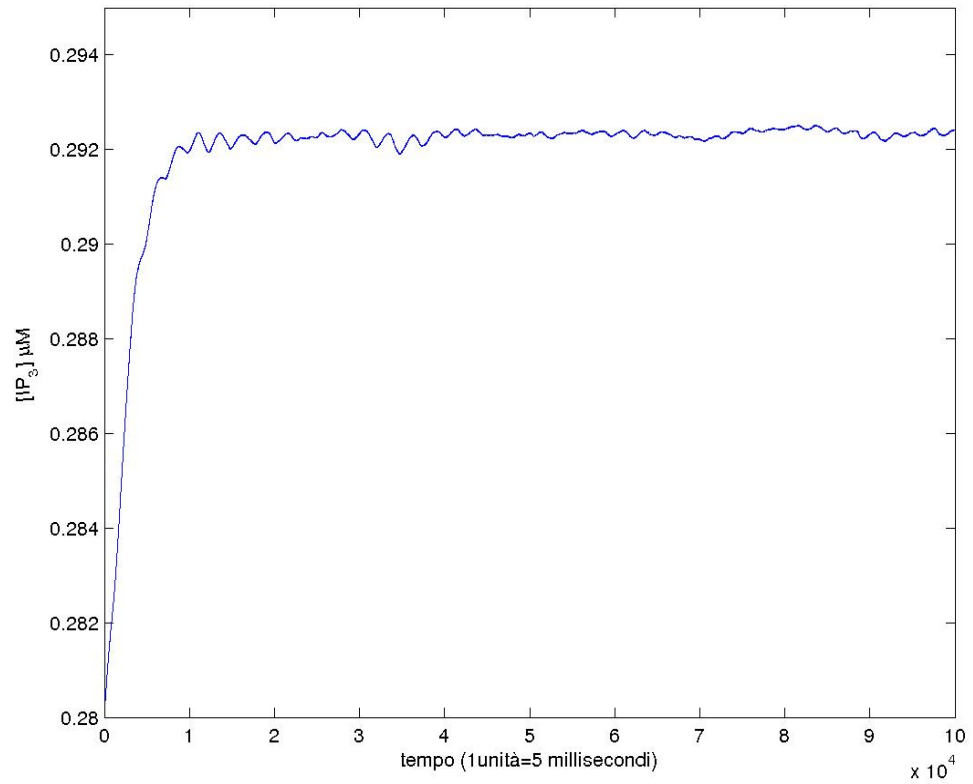


Figura 3.6: Variazione della concentrazione dell' IP_3 medio della matrice di astrociti in funzione del tempo (caso $I_{astro} \neq 0$). L' IP_3 medio mostra delle piccole oscillazioni attorno ad un valore medio di circa $0.292 \mu M$.

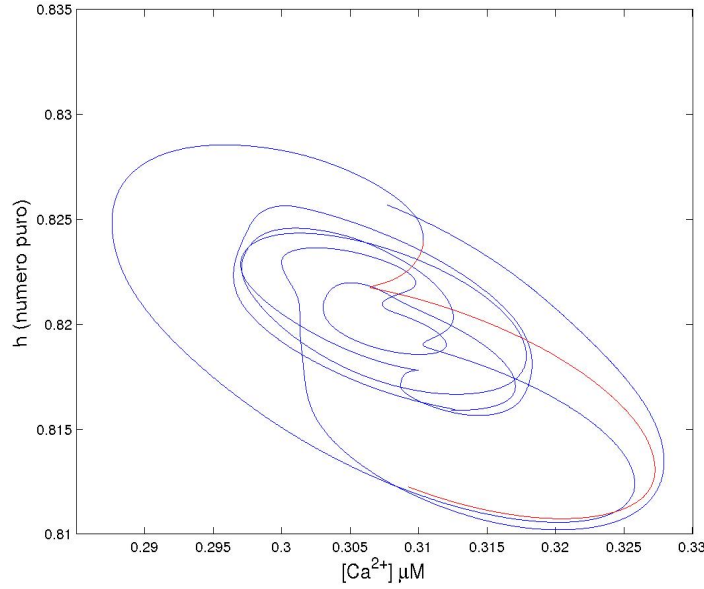


Figura 3.7: Traiettorie nello spazio $h-c$ per le variabili h e c mediate su tutta la matrice di astrociti. La linea blu corrisponde agli ultimi settantacinque secondi dell'orbita mentre quella rossa corrisponde agli ultimi sette.

Osservando la figura (3.5) vediamo che il sistema viene attratto verso un'orbita limitata ma non chiusa. Ciò risulta più chiaro osservando la figura (3.7) in cui riportiamo in blu gli ultimi settantacinque secondi del plot di figura (3.5) mentre in rosso riportiamo gli ultimi sette. Tale dinamica è essenzialmente determinata dalle interazioni tra astrociti e neuroni, ovvero il sistema viene forzato a stare nell'orbita di figura (3.5) a causa della “forza esterna” determinata dall'interazione neurone→astrocita e astrocita→neurone.

Le correnti astrocitarie Le correnti che i neuroni ricevono dagli astrociti vicini (ovvero l'interazione astrocita→neurone) oscillano su tempi molto lunghi rispetto a quelli che caratterizzano la dinamica neuronale. Abbiamo registrato tali correnti campionandole sempre con la frequenza di un punto ogni 5 millisecondi e ne riportiamo l'andamento in figura (3.8) per alcuni neuroni della rete.

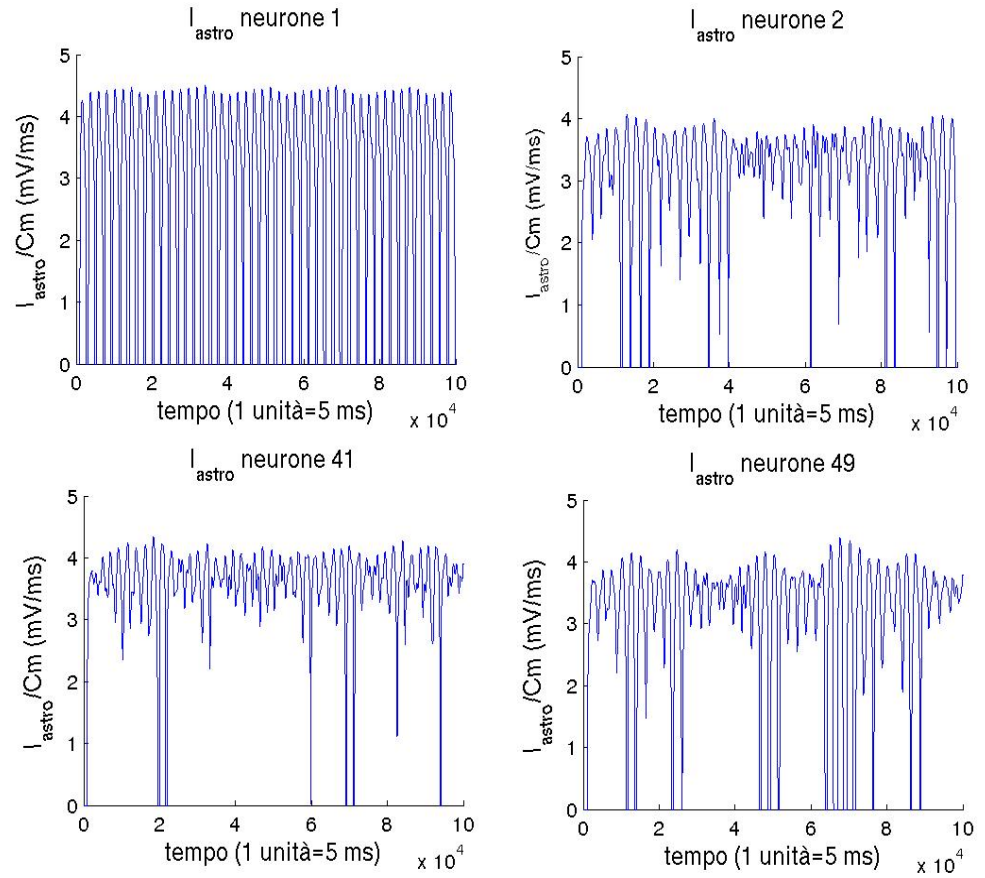


Figura 3.8: Andamento in funzione del tempo della corrente I_{astro} per alcuni neuroni. Gli astroцити iniettano correnti che oscillano ad una frequenza di circa 0.1 Hz , ovvero su tempi molto lunghi rispetto ai tempi coinvolti nella dinamica neuronale (un neurone può emettere anche più di 10 spike in un secondo).

Lo spazio delle fasi dei neuroni Lo stato di ogni neurone della rete è caratterizzato da due variabili: v e u . Quindi per una rete con N neuroni si hanno $2N$ variabili e lo stato del sistema è dunque un punto in uno spazio $2N$ dimensionale. Anche per i neuroni, così come per gli astrociti, abbiamo considerato le variabili medie, ovvero quelle che si ottengono sommando le singole variabili dei neuroni della rete e dividendo per il numero totale di neuroni. Così possiamo riportare in uno spazio delle fasi bidimensionale la traiettoria “media” di un neurone. Poichè però entrambe le variabili u e v variano sulla scala del millisecondo in questo caso è stato necessario registrarle con la frequenza di campionamento di un punto ogni millisecondo, ovvero ogni step temporale della simulazione. In figura (3.9) è riportata in blu la traiettoria per i primi 450 secondi mentre in rosso quella per gli ultimi 50 secondi. Anche in questo caso il sistema viene attratto su un’orbita limitata ma non chiusa, e tale orbita è determinata dagli input talamici e dalle correnti astrocitarie di figura (3.8).

Il ruolo degli astrociti nella rete neuro gliale simulata si può mettere in evidenza soltanto vedendo cosa succede nel caso in cui la loro interazione con i neuroni venisse a mancare. Abbiamo quindi effettuato una nuova simulazione in cui le correnti astrocitarie sono spente. Esponiamo qui di seguito i risultati.

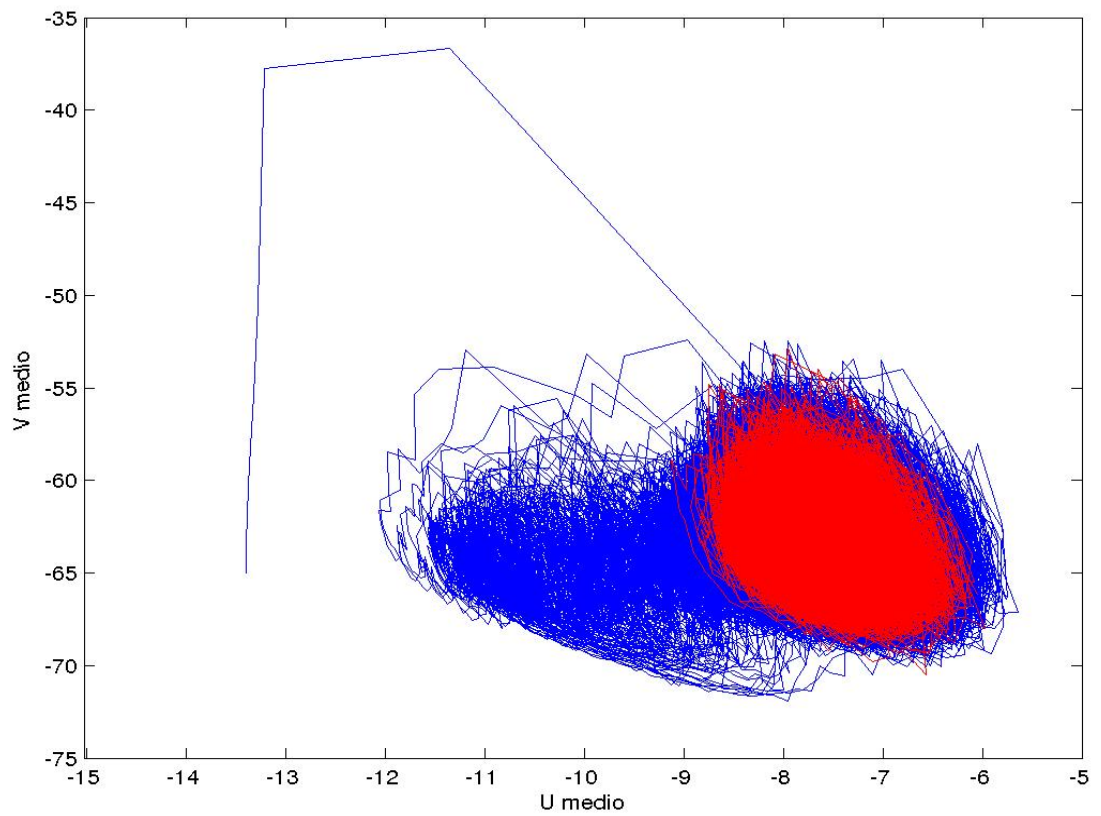


Figura 3.9: Traiettorie nello spazio $u - v$ per le variabili u e v mediate su tutti i neuroni della rete nel caso $I_{astro} \neq 0$. In rosso riportiamo gli ultimi 50 secondi dell'orbita.

Rete con $I_{astro} = 0$ La simulazione successiva coinvolge lo stesso tipo di rete usata nella precedente. In questo caso però è stata “spenta” l’interazione astrocita→neurone. I neuroni della rete lavorano quindi indipendentemente da quello che accade nella sottostante matrice astrocitaria che, per loro, è come se fosse completamente assente. In figura (3.10) riportiamo i density plot della concentrazione di calcio registrata a vari istanti della simulazione. I pattern prodotti in questo caso non differiscono come struttura da quelli osservati nel caso $I_{astro} \neq 0$.

In figura (3.11) riportiamo, come per la simulazione precedente, l’andamento temporale del calcio medio campionato un punto ogni cinque millisecondi. La frequenza misurata è sempre circa 0.06 Hz , ma il valore medio dell’oscillazioni è leggermente più basso, ovvero è pari a $0.2605\text{ }\mu\text{M}$. Questo si spiega molto facilmente: avendo tolto l’interazione I_{astro} , che è sempre positiva, i neuroni sono meno stimolati e tendono a produrre, in media, un minor rilascio di IP_3 e, quindi, di calcio.

Anche in questo caso il sistema viene attratto verso un’orbita limitata ma non chiusa come mostrano i plot di figura (3.12) e (3.13). Da questi grafici è possibile vedere che la presenza degli astrociti ha come effetto principale quello di spostare le orbite nello spazio delle fasi. In figura (3.13) riportiamo infatti l’orbita nello spazio $c - h$ (con c calcio medio e h variabile di canale media). In blu riportiamo l’orbita per il caso $I_{astro} = 0$ e in rosso quella per il caso $I_{astro} \neq 0$. L’interazione astrocita→neurone sposta l’orbita nel piano $c - h$. Lo stesso accade per il plot nello spazio $u - v$ (sempre intendendo con u e v la variabile di recupero e il potenziale di membrana mediati sui neuroni della rete). In figura (3.12) riportiamo in blu i primi 450 secondi dell’orbita e in rosso gli ultimi 50 per il caso $I_{astro} = 0$. Confrontando con il grafico di figura (3.9) (ovvero con il caso $I_{astro} \neq 0$) è evidente che l’interazione I_{astro} sposta il sistema su un’orbita con valori più alti (in media) per le variabili u e v .

In conclusione possiamo dire che non esiste un effetto notevole da parte degli astrociti sulle variabili dinamiche medie della rete neuro-gliale.

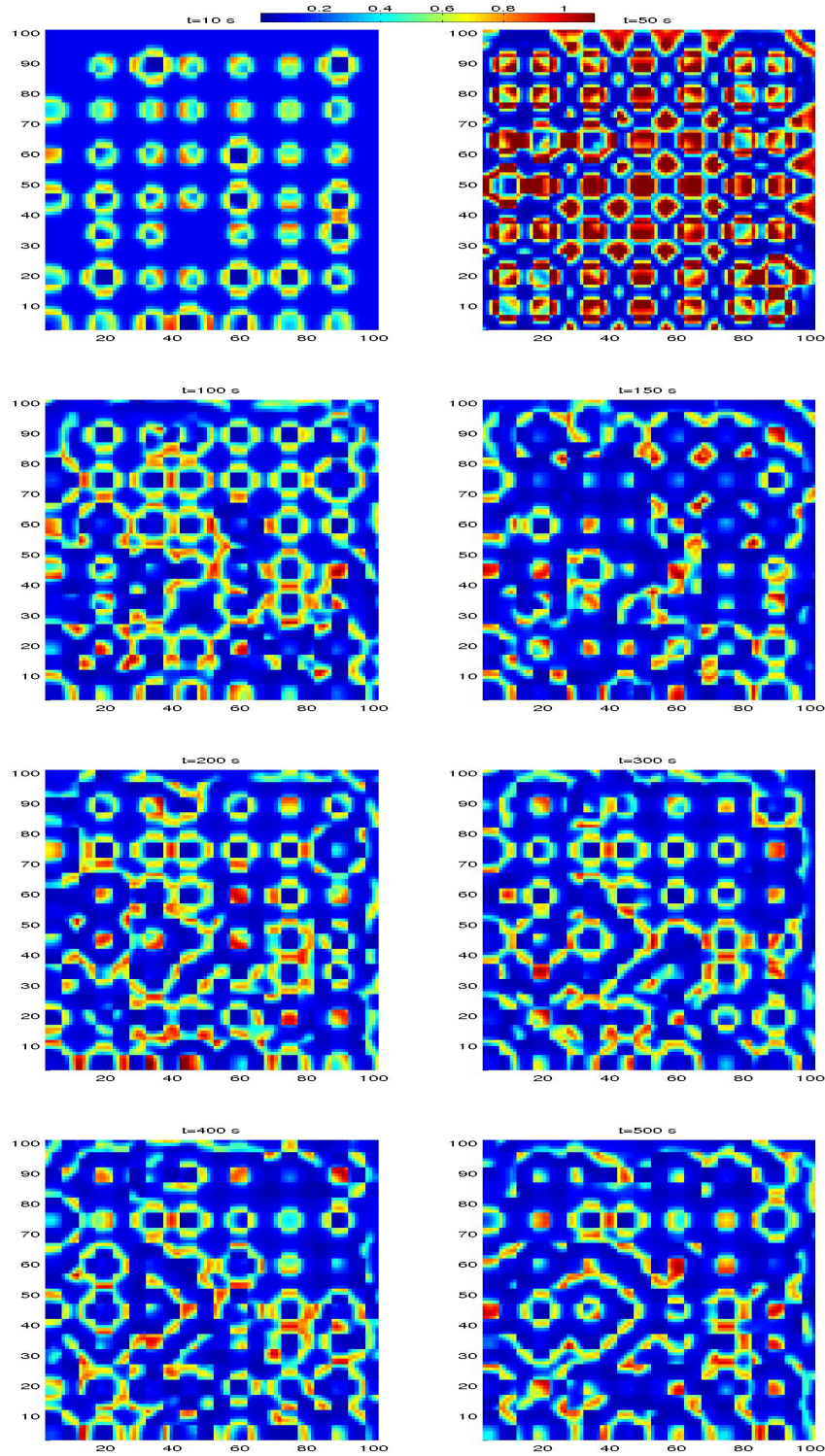


Figura 3.10: Density plot della concentrazione del calcio nella matrice di astrociti. L'unità di misura spaziale è $6 \mu m$ come nelle simulazioni precedenti (ogni astrocita è stato diviso in una matrice 5×5). La barra dei colori in alto indica la concentrazione di $[Ca^{2+}]$ espressa in micromoli. In questo caso è stata spenta l'interazione astrocita \rightarrow neurone.

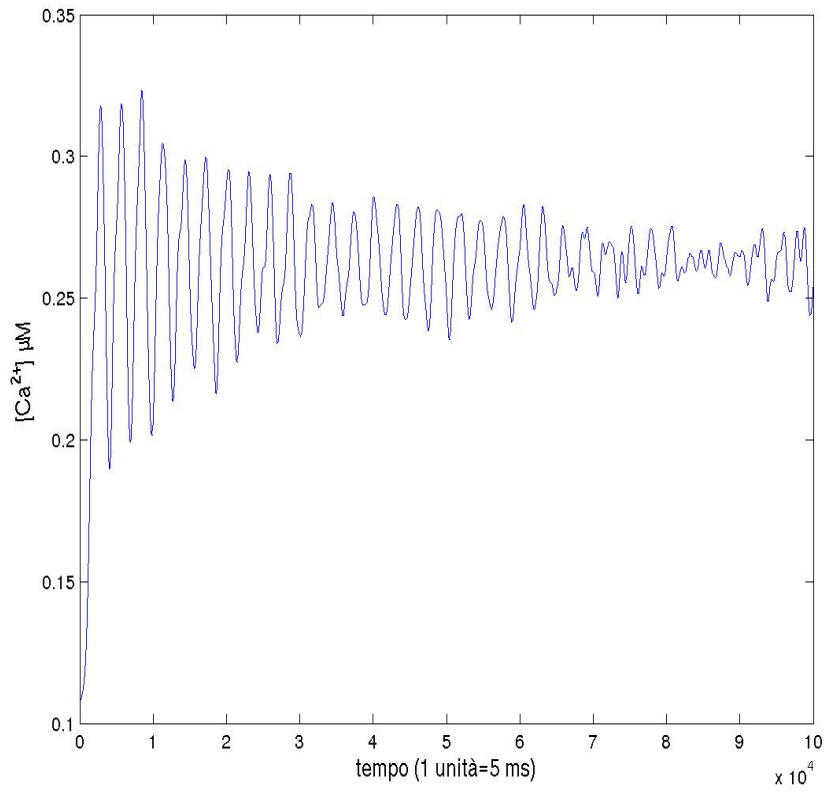


Figura 3.11: Andamento temporale della quantità di calcio medio della matrice di astrociti nel caso $I_{astro} = 0$. Il calcio medio oscilla con una frequenza di 0.06 Hz attorno ad un valore medio di $0.2611\text{ }\mu\text{M}$. Non si hanno sostanziali modifiche rispetto al caso $I_{astro} \neq 0$.

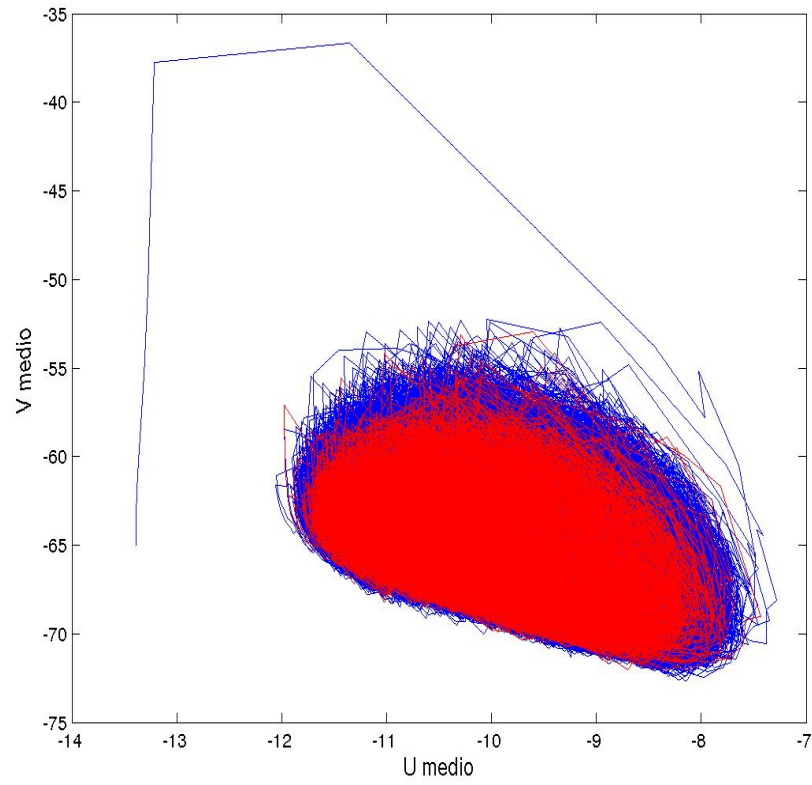


Figura 3.12: Traiettorie (linea blu) nello spazio $u - v$ per le variabili u e v mediate su tutti i neuroni della rete nel caso $I_{astro} = 0$. In rosso riportiamo gli ultimi 50 secondi dell'orbita.

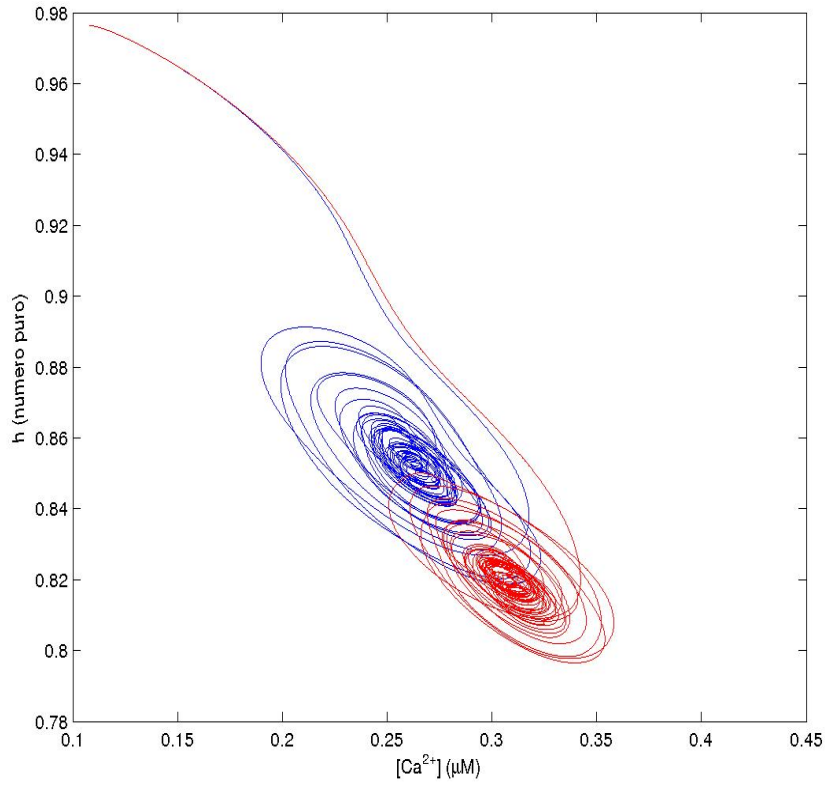


Figura 3.13: Traiettoria nello spazio $h - c$ per le variabili h e c mediate su tutta la matrice di astroцити. La linea blu corrisponde al caso $I_{astro} = 0$, la linea rossa al caso $I_{astro} \neq 0$ ma. La differenza tra le due orbite consiste semplicemente in uno spostamento.

3.4 Rete autonoma

Nelle simulazioni della sezione (3.3.1) la rete neurale veniva stimolata dagli input talamici per tutta la durata della simulazione. Per capire se la rete riesce ad autosostenere una propria attività abbiamo simulato una rete neuro-gliale identica a quelle della sezione precedente con la sola differenza che gli input talamici vengono inseriti nei neuroni soltanto per i primi dieci secondi di attività. Dal decimo secondo in poi la rete neuro-gliale evolve quindi solo grazie alle interazioni interne alla rete stessa. In figura (3.14) riportiamo i density plot della concentrazione di calcio registrata ogni cinque secondi di simulazione. Dai plot è ben evidente che con gli input talamici spenti ($t > 10$ s) soltanto in un punto della rete continuano a generarsi onde circolari. In tale punto (per essere precisi è quello di coordinate (17, 31)) è posizionato il neurone 42 che è un neurone inibitorio ed ha il valore più alto del parametro b della rete (per la precisione $b_{42} = 0.2490$). Come già detto nell sezione (2.3) i neuroni con b vicino a 0.25 sono neuroni low-threshold spiking, possiedono ovvero un basso potenziale di soglia.

Nel nostro caso il neurone 42 non è l'unico neurone a emettere spike dopo lo spegnimento degli input talamici. In figura (3.15) riportiamo la mappa degli spike dei neuroni della rete (un punto del grafico corrisponde ad uno spike da parte del neurone il cui numero identificativo è riportato sull'asse verticale emesso all'istante riportato sull'asse orizzontale). Dalla figura si nota che dopo lo spegnimento degli input talamici tutti i neuroni eccitatori cessano la loro attività senza più riprenderla. In assenza di astrociti anche i neuroni inibitori low-threshold spiking non riprenderebbero ad emettere impulsi. La presenza di onde di calcio nella matrice fa sì che le correnti astrocitarie non cessino subito permettendo a tre neuroni (42, 46 e 49 vedi figura (3.15)) di continuare la loro attività.

Tuttavia l'attività nella rete cessa nonostante la presenza degli astrociti.

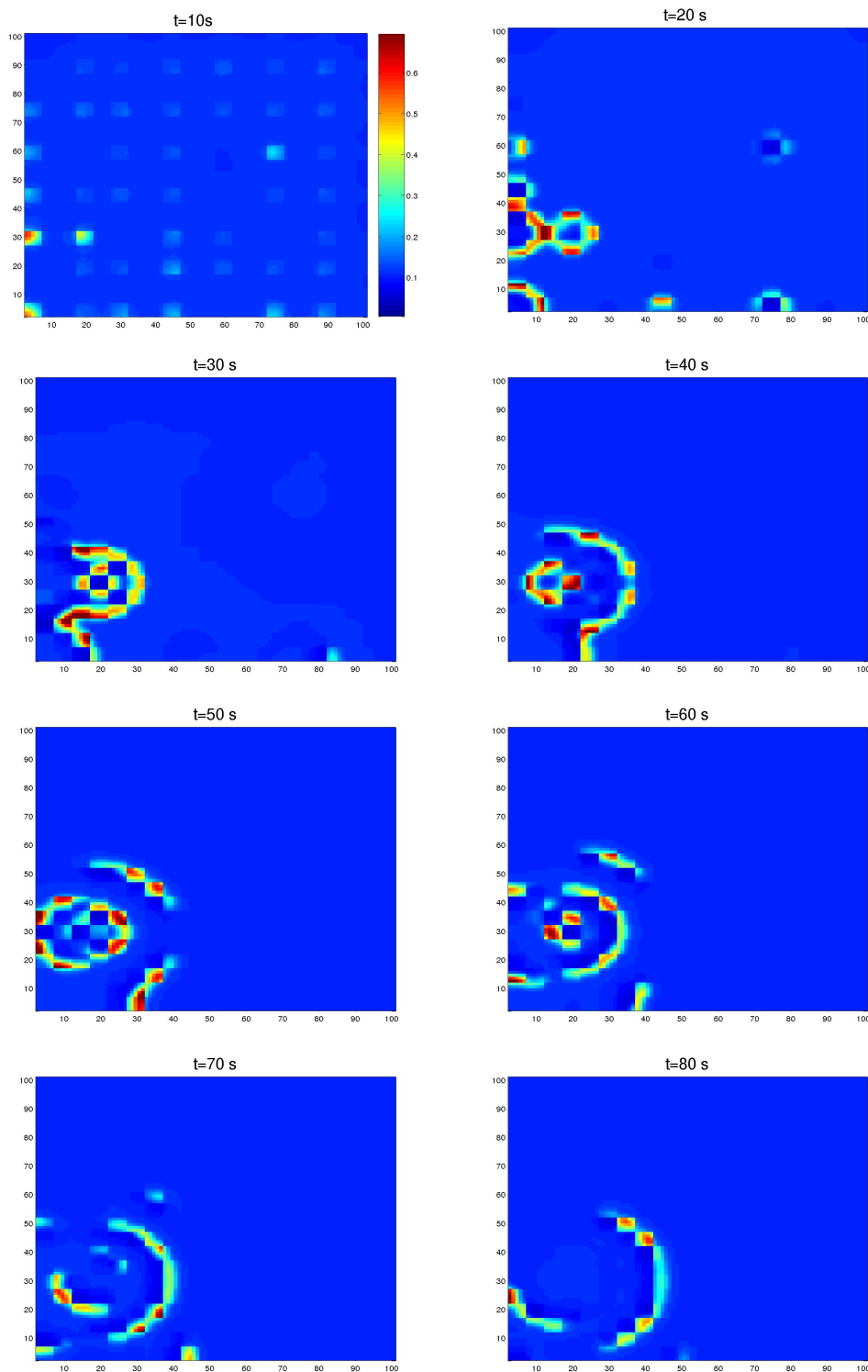


Figura 3.14: Density plot della concentrazione di calcio per una rete neurop-gliale in cui all'istante $t = 10s$ sono stati spenti gli input talamici. Solo nella zona in cui è posto il neurone 42 continuano a generarsi onde di calcio per circa altri 50 secondi dopo lo spegnimento degli input talamici. La rete non autosostiene una propria attività. La scala dei colori è riportata in alto a sinistra ed esprime sempre la concentrazione di calcio in micromoli. Una unità spaziale corrisponde a $6\mu m$.

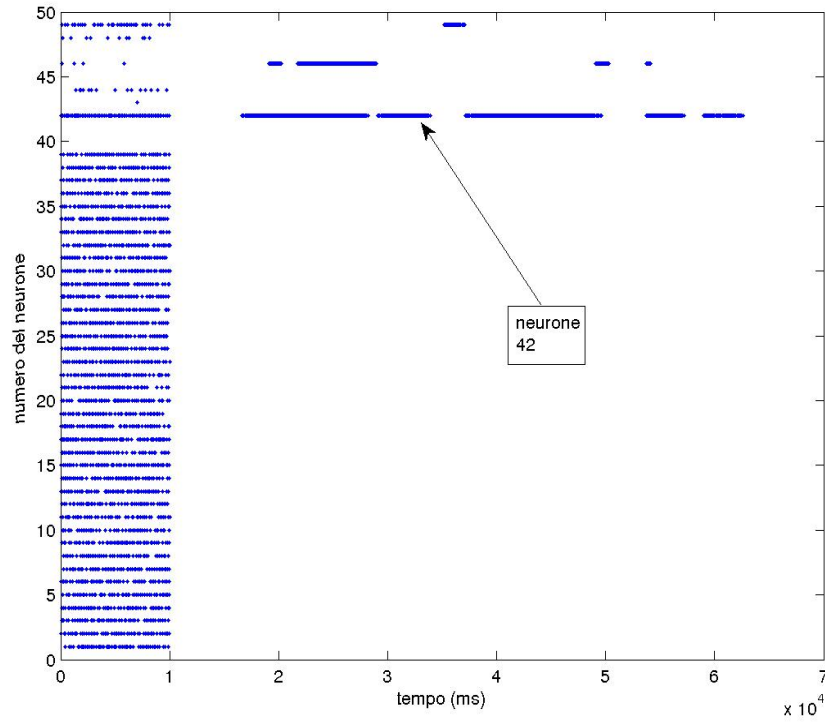


Figura 3.15: Schema dell'emissione di spike della rete neurale in cui all'istante $t = 10$ s vengono spenti gli input talamici. In assenza di input talamici tutti i neuroni eccitatori (neuroni numerati dall'1 al 39) cessano istantaneamente la propria attività. Solo alcuni neuroni inibitori (numerati dal 40 al 49) continuano ad emettere impulsi di tensione anche dopo l'istante $t = 10$ s, ma solo per un tempo finito.

E' possibile ottenere una rete che riesca ad autosostenere una propria attività aumentando la quantità di IP_3 rilasciata ogni volta che il potenziale di un neurone supera il valore di soglia V_S . Di seguito riportiamo i density plot per il calcio nel caso in cui la quantità Q_{IP_3} venga raddoppiata rispetto alla simulazione precedente, ovvero nel caso in cui $Q_{IP_3} = 0.018 \mu M$. Anche in questo caso all'istante $t = 10 s$ vengono spenti gli input talamici.

I density plot riportati nelle figure (3.16-3.17) sono presi a vari istanti e da essi si vede che la rete non cessa la propria attività neanche dopo quattrocento secondi, ed è quindi chiaro che riesce ad autosostenersi. Nel primo (fig.3.16) è possibile vedere la formazione di un'onda di calcio a spirale sulla sinistra della matrice (che è stata riportata nell'ingrandimento). Nel secondo (fig.3.17), invece, riportiamo, in un ingrandimento, la formazione di un fronte d'onda piano. Se la matrice genera onde piane è chiaro, per quanto visto nella sezione (1.3.3), che possono formarsi anche onde a spirale. Le onde di calcio a spirale sono state osservate sperimentalmente in colture di astrociti come già riportato nella sezione (1.3.3). La simulazione riesce quindi a riprodurre questo particolare aspetto dinamico delle onde di calcio astrocitarie.

L'attività della rete non è mantenuta da tutti i neuroni, sono solo i neuroni inibitori che emettono spike e generano le onde di calcio negli astrociti. Una volta spenti gli input talamici sono solo le correnti astrocitarie (regolate a loro volta dalle onde di calcio) a poter stimolare i neuroni (senza dimenticare che i neuroni possono stimolarsi a vicenda grazie alle connessioni sinaptiche). Come visto nella sezione (3.3.1) i neuroni inibitori hanno un b maggiore rispetto a quelli eccitatori e questo si riversa in un potenziale di soglia minore. In figura (3.18) riportiamo il plot di emissioni di spike della rete neurale tra l'istante $t = 99500 s$ e l'istante $t = 100000 s$. I neuroni eccitatori sono quelli numerati dall'uno al trentanove, dal quaranta al quarantanove sono numerati i neuroni inibitori. Dalla figura (3.18) è allora ben evidente che solo quelli inibitori emettono spike e regolano quindi l'attività della rete insieme agli astrociti.

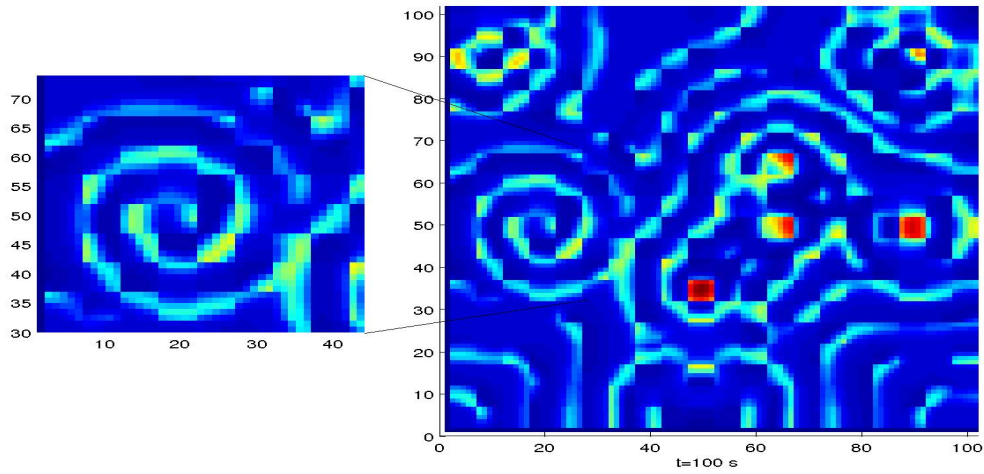


Figura 3.16: Density plot del calcio all'istante $t = 100$ s per una rete neuro gliale in cui il parametro Q_{IP_3} è stato portato a $0.018 \mu M$. Nell'ingrandimento è mostrata la presenza di un'onda a spirale. Una unità spaziale corrisponde a $6 \mu m$.

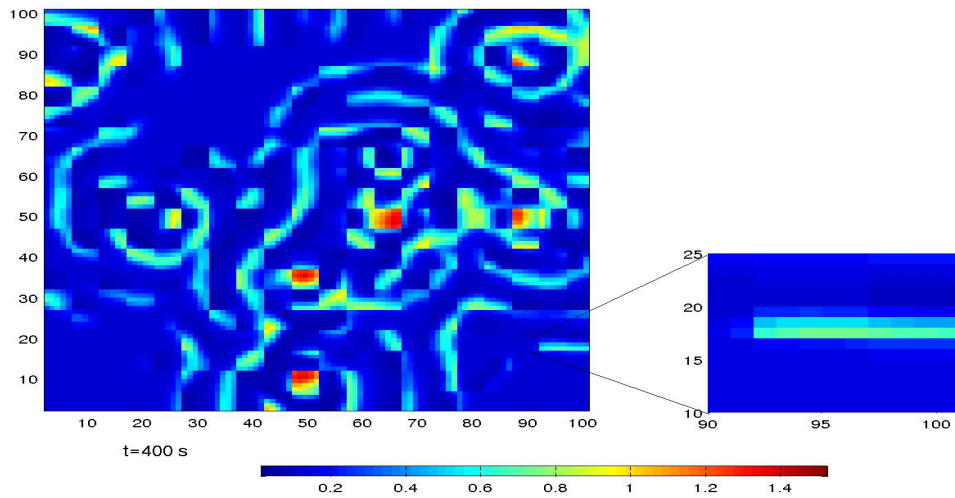


Figura 3.17: Come sopra ma per $t = 400$ s. Nell'ingrandimento è mostrata la presenza di un'onda piana. La barra dei colori esprime la concentrazione di calcio in micromoli. Una unità spaziale corrisponde a $6 \mu m$.

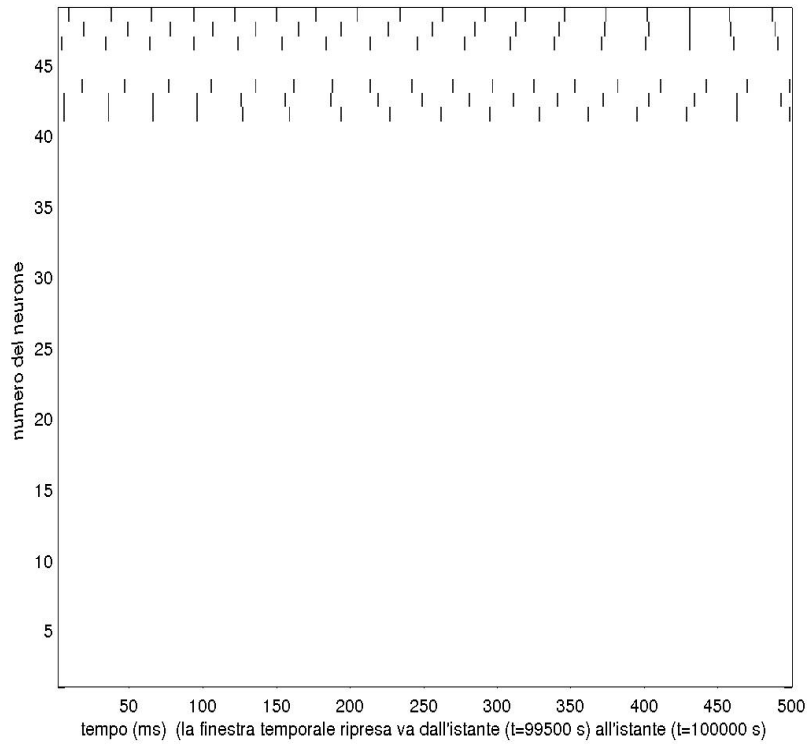


Figura 3.18: Schema dell'emissione di spike della rete neurale in cui il parametro Q_{IP_3} è stato portato a $0.018 \mu M$. La rete autosostiene una propria attività, in particolare solo i neuroni di tipo inibitorio (neuroni 40 – 49) continuano ad emettere impulsi.

Capitolo 4

Reti con attività spontanea

I neuroni utilizzati nelle simulazioni del capitolo precedente non possedevano una attività spontanea, ovvero non ammettevano un ciclo limite stabile. Questo significa che in assenza di input il neurone giace nel suo stato di riposo e non produce alcun impulso. Il nostro scopo ora è quello di studiare l'influenza degli astrociti su una rete neurale dotata di attività spontanea. Per capire come introdurre un'attività spontanea nella rete neurale ripartiamo dalle equazioni del modello di Izhikevich.

4.1 Il modello di Izhikevich per neuroni dotati di attività spontanea

Per comodità di esposizione riportiamo qui di seguito le equazioni di Izhikevich in assenza di input esterni:

$$\frac{dv}{dt} = 0.04 v^2 + 5 v + 140 - u \quad (4.1)$$

$$\frac{du}{dt} = a (b v - u) \quad (4.2)$$

Ammettiamo di essere in condizioni di equilibrio. Questo corrisponde a porre $(dv/dt) = (du/dt) = 0$ nelle (4.1)-(4.2), quindi indicando con u_{eq} e v_{eq} i valori delle variabili in condizioni di equilibrio si ha:

$$u_{eq} = b v_{eq} \quad (4.3)$$

$$0 = 0.04 v_{eq}^2 + 5 v_{eq} + 140 - u_{eq} \quad (4.4)$$

Risolvendo le (4.3)-(4.4) si ottengono due possibili valori per v_{eq} :

$$v_{eq}^{(1,2)} = \frac{b - 5 \pm \sqrt{b^2 - 10b + 2.6}}{0.008} \quad (4.5)$$

Quindi per i valori di b tali che

$$b^2 - 10b + 2.6 \leq 0 \quad (4.6)$$

lo stato stazionario non esiste, il neurone possiede quindi una sua attività autonoma anche in assenza di stimoli. Un facile calcolo mostra che tali valori sono compresi nell'intervallo $0.267 \leq b \leq 9.73$. Tuttavia per $b \geq 9.73$ si ottengono valori di equilibrio maggiori di 30 mV , che non possono essere raggiunti mai dalla variabile v a causa della condizione di reset:

$$\text{se } v \geq 30 \text{ mV} \quad \text{allora} \quad \begin{cases} v \rightarrow c \\ u \rightarrow u + d \end{cases}$$

Nel grafico di figura (4.1) mostriamo varie traiettorie nello spazio $u - v$ per un neurone con parametri $(a, c, d) = (0.1, -50, 2)$ e vari valori di b .

Per $b \geq 0.9$ il neurone ammette un ciclo limite stabile. Chiaramente b non può essere arbitrariamente alto: con l'aumentare di b aumenta la frequenza di oscillazione del potenziale di membrana che, nella realtà, ha un limite superiore imposto dalla presenza di tempi di recupero non nulli.

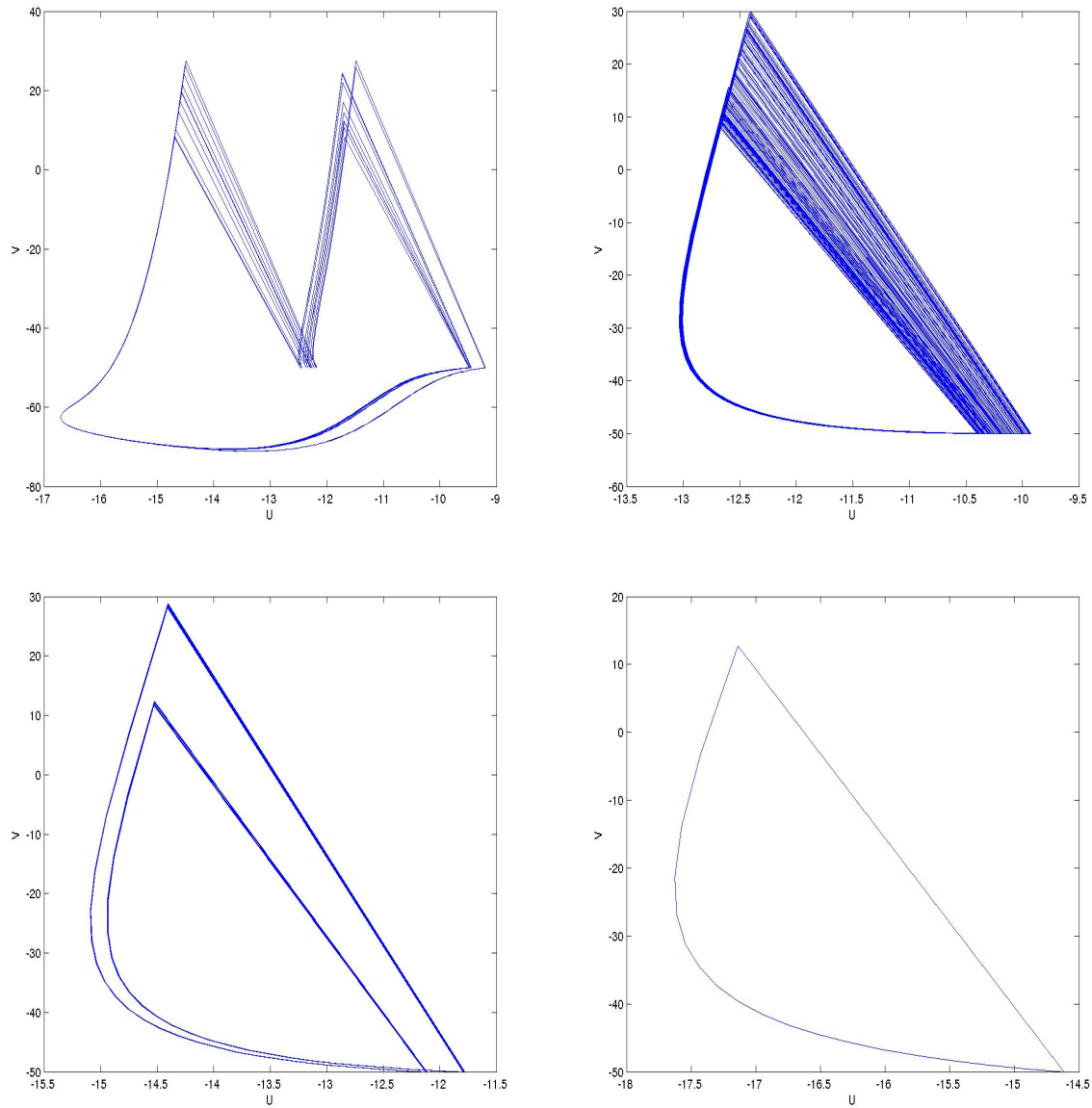


Figura 4.1: Traiettorie nel piano $u - v$ per vari valori di b . In alto a sinistra $b = 0.267$, in alto a destra $b = 0.5$, in basso a sinistra $b = 0.7$, in basso a destra $b = 0.9$. Per $b = 0.9$, o valori maggiori, esiste un ciclo limite stabile, il sistema si stabilizza su un'orbita chiusa. In tutti e quattro i plot riportiamo gli ultimi 500 millisecondi di attività, ovvero non consideriamo il transiente.

4.2 Simulazione di una rete autonoma

I parametri della rete Consideriamo ora una rete di 49 neuroni (39 eccitatori e 10 inibitori) che sia formata da neuroni con attività autonoma (quindi con $b \geq 0.267$). Diversamente dalle simulazioni precedentemente effettuate non consideriamo più la presenza di input esterni alla rete, ovvero spegniamo gli input talamici. La comunicazione tra neuroni avviene, come in precedenza, grazie alla matrice delle connessioni sinaptiche $S = s_{ij}$ così come discusso nella sezione (3.2).

Per tutti i neuroni eccitatori e inibitori il valore di b è stato regolato a 0.268. Tale valore è grande rispetto a quello usato fino ad ora e ciò si rivela in una maggiore frequenza di emissione di spike da parte dei neuroni. Per evitare di avere una rete eccessivamente attiva abbiamo allora ridotto il valore di a , rallentando così la dinamica della rete. Il valore di a è stato regolato a 0.02 per tutti i neuroni eccitatori e a 0.01 per tutti i neuroni inibitori.

4.2.1 L'attività della rete senza astrociti

In figura (4.2) riportiamo il plot dell'emissione degli spike della rete a vari intervalli di tempo. In questa prima simulazione abbiamo spento l'interazione astrocita→neurone, la rete è quindi una rete puramente neurale. Come in precedenza i neuroni dal numero uno al trentanove sono eccitatori e i restanti sono inibitori. Dai plot è possibile vedere che la rete produce onde di sincronizzazione (linee verticali scure) con una frequenza di circa 10 Hz. Per la precisione sono presenti due tipi di eventi di sincronizzazione; entrambi sono onde a 10 Hz, ma uno coinvolge tutti i neuroni della rete, mentre l'altro coinvolge solo alcuni neuroni eccitatori. Questo tipo di onde sono state osservate nel cervello e vengono chiamate onde alpha. Le onde alpha (note anche come ritmo di *Berger*) sono genericamente associate ad uno stato di veglia rilassata (vedi [20]).

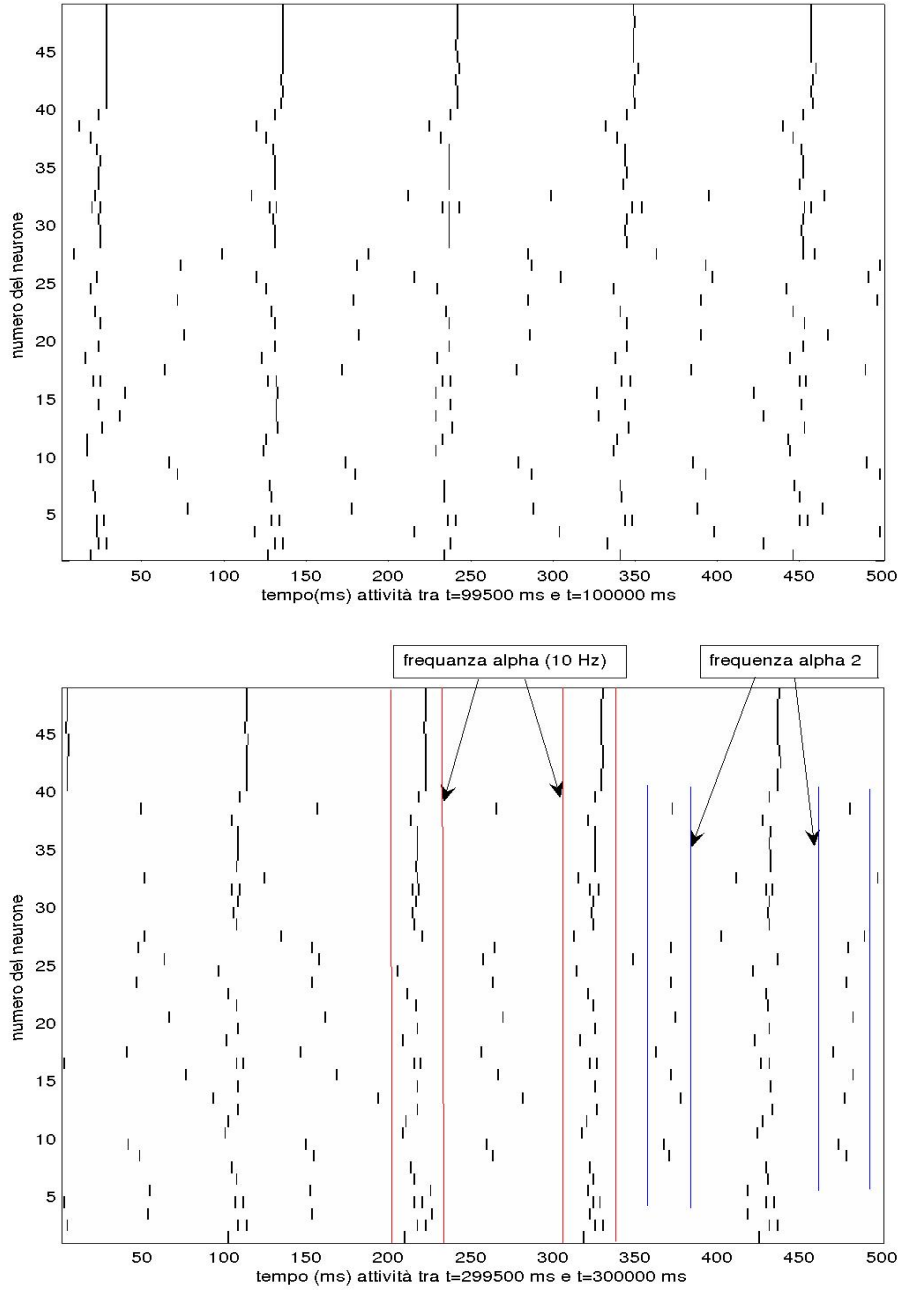


Figura 4.2: Emissione degli spike della rete tra $t = 99500 \text{ ms}$ e $t = 100000 \text{ ms}$ (in alto) e tra $t = 299500 \text{ ms}$ e $t = 300000 \text{ ms}$ (in basso). Si nota che in entrambi i plot sono presenti due tipi di eventi di sincronizzazione e che i pattern di emissione sono gli stessi, ovvero la rete è sicuramente all'equilibrio dopo 90 s di attività. Entrambi gli eventi di sincronizzazione sono onde a 10 Hz (denominate nel grafico in basso *alpha* e *alpha 2*) ma le onde alpha (racchiuse tra due linee rosse nel grafico in basso) coinvolgono un maggior numero di neuroni delle onde alpha 2 (delimitate da due linee blu sempre nel grafico in basso).

4.2.2 Statistica degli intervalli inter-spike

Uno studio dettagliato della attività della rete si può ottenere considerando la serie temporale degli intervalli inter-spike.

Siano $t_1^{(i)}, \dots, t_N^{(i)}$ gli istanti temporali in cui il neurone i emette uno spike (la successione degli istanti è chiaramente finita essendo finito il tempo di simulazione). Consideriamo una nuova successione: $d_1^{(i)} = t_2^{(i)} - t_1^{(i)}, \dots, d_{N-1}^{(i)} = t_N^{(i)} - t_{N-1}^{(i)}$, ovvero la successione degli intervalli inter-spike del neurone i . Avendo 49 neuroni abbiamo 49 successioni di intervalli inter-spike. Chiamiamo d l'unione di queste successioni: $d = \bigcup_i d^{(i)}$. Si può ricavare facilmente la distribuzione di probabilità degli intervalli inter-spike istogrammando la variabile d come facciamo in figura (4.3). Dalla figura è ben visibile che la distribuzione degli intervalli inter-spike ha tre picchi (indicati in figura come A, B, C).

Il picco A ($\Delta t_{picco A} \approx 5 ms$) è facilmente spiegabile con la presenza di neuroni della rete che emettono un 'doppio-impulso' con una distanza inter-spike proprio di $5 ms$. Osservando infatti il grafico di figura (4.2) si vede che il neurone 4 (ma anche altri neuroni come, ad esempio, il neurone 31) emette una coppia di impulsi con una distanza inter-spike di $5 ms$. Questo comportamento è dovuto al tipo di parametri che caratterizzano questo tipo di neuroni: si tratta di neuroni di tipo CH (vedi figura (2.4)), ovvero con potenziali di reset molto alti ($c \approx -50 mV$) e con un moderato salto post-spike della variabile u ($d \approx 2$). In figura (4.4) e (4.5) mostriamo, rispettivamente, il plot nello spazio $u-v$ e l'andamento del potenziale di azione per il neurone 4.

Il picco C è in corrispondenza della frequenza di oscillazione delle onde alpha ed è ovviamente quello che riceve più contributi poichè tutti i neuroni sono coinvolti o nell'onda alpha o nell'onda alpha 2.

La presenza del picco B , più piccolo del picco C , ci dice che è presente anche un terzo stato possibile di emissione. Si tratta di uno stato meno "probabile" (la rete non ha alcun input random, quindi si tratta di una rete deterministica) rispetto a quello corrispondente allo stato C ed ha una frequenza di emissione leggermente maggiore.

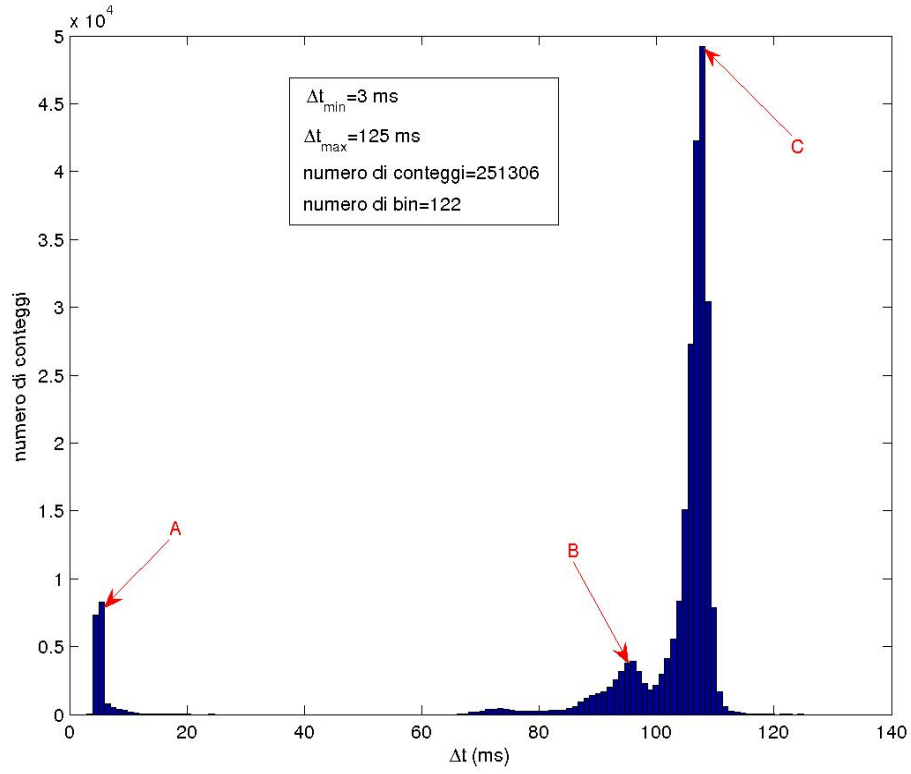


Figura 4.3: Istogramma della successione d di tutti gli intervalli inter-spike della rete in assenza di astrociti. I dati sono stati ottenuti simulando 500000 ms di attività. Sono presenti tre picchi distinti (A,B,C) a tre valori diversi per l'intervallo inter-spike ($\Delta t_{\text{picco A}} \approx 5 \text{ ms}$, $\Delta t_{\text{picco B}} \approx 95 \text{ ms}$, $\Delta t_{\text{picco C}} \approx 107 \text{ ms}$).

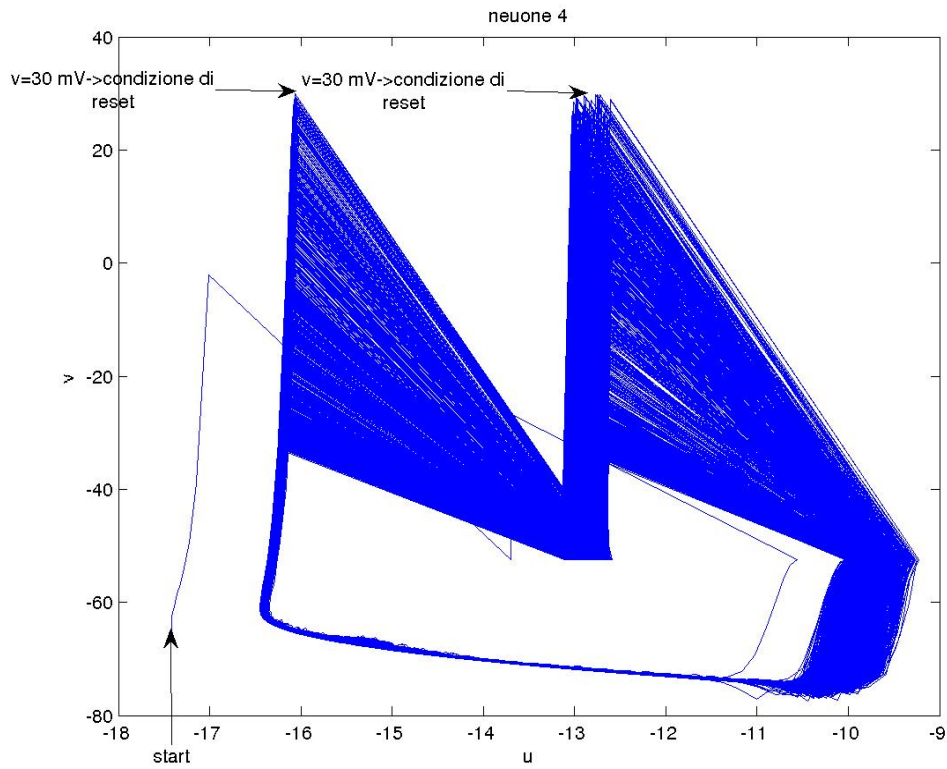


Figura 4.4: Plot $u-v$ per i primi 100 s di attività del neurone 4. La dinamica del neurone è a doppio spike (CH). E' la presenza di tali neuroni che genera il picco A di figura (4.3).

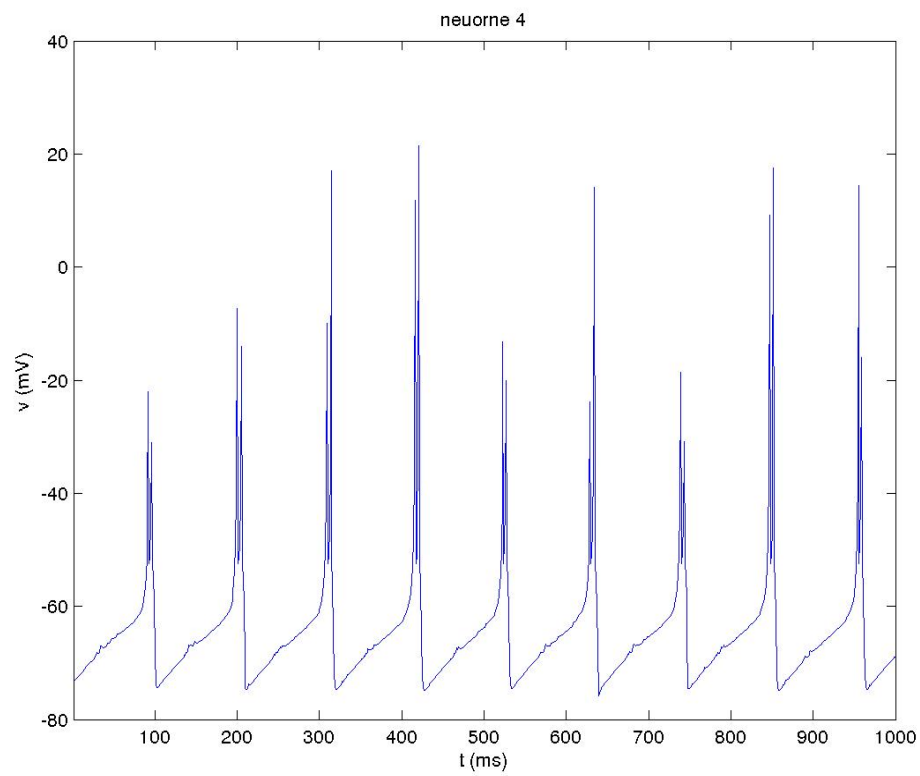


Figura 4.5: Andamento del potenziale di azione del neurone 4 tra gli istanti $t = 99$ s e $t = 100$ s. La distanza misurata tra i due spike di un doppio-spike è 5 ms.

Entropia Ad ogni intervallo inter-spike Δt possiamo associare una probabilità definita dal rapporto tra il numero di volte che è stato conteggiato tale intervallo e il numero di intervalli conteggiati in totale. Avendo diviso il range $[\Delta t_{min} - \Delta t_{max}]$ in 122 parti otteniamo 122 frequenze. Ricaviamo così la distribuzione di probabilità $P(\Delta t)$ per la variabile Δt e la corrispondente entropia:

$$S \equiv - \sum_i P(\Delta t_i) \log(P(\Delta t_i)) = 2.8 \quad (4.7)$$

4.2.3 Rete autonoma con astrociti

Un possibile ruolo che si potrebbe attribuire agli astrociti è quello di creare un certo livello di disordine nella rete neurale.

Come abbiamo visto nel paragrafo precedente in assenza di astrociti si presenta nella rete un fenomeno di sincronizzazione globale a circa $10 Hz$. Eventi di sincronizzazione ad alta frequenza di grandi aggregati neuronali possono essere associati a disturbi come l'epilessia. La presenza degli astrociti, introducendo delle correnti aggiuntive nei neuroni diverse da neurone a neurone, potrebbe quindi ridurre il fenomeno della sincronizzazione quando ne coinvolge un numero eccessivo.

Abbiamo ripetuto la simulazione del paragrafo precedente accendendo l'interazione astrocita→neurone e ripetendo misure identiche a quelle del paragrafo precedente. In figura (4.6) riportiamo il plot degli spike della rete autonoma con la presenza degli astrociti tra due istanti della simulazione. Nessun evento di sincronizzazione globale è ora presente. La statistica degli intervalli inter-spike è riportata invece in figura (4.7). Da quest'ultima figura si nota che è sparito il picco sul valore del ritardo corrispondente alla frequenza delle onde alpha, ma sono presenti tre picchi più piccoli in corrispondenza di $\Delta t_1 = 3 ms$, $\Delta t_2 = 38 ms$ e $\Delta t_3 = 49 ms$.

Il picco 1 è sempre dovuto alla presenza di neuroni CH nella rete. In assenza degli astrociti solo un'emissione era nettamente favorita rispetto alle altre (picco C di figura (4.3)), l'introduzione degli astrociti ha spostato l'emissione su intervalli inter-spike più piccoli (frequenze maggiori) ed ha prodotto due stati di emissione equipopolati (picco 2 e 3 di figura (4.7)).

Anche in questo caso abbiamo calcolato la distribuzione di probabilità $P(\Delta t)$ e la corrispondente entropia:

$$S \equiv - \sum_i P(\Delta t_i) \log(P(\Delta t_i)) = 3.1 \quad (4.8)$$

Confrontando la (4.7) con la (4.8) si vede che l'introduzione degli astrociti

ha portato ad un aumento di entropia; avendo distribuito equamente l'emissione di spike su due frequenze era logico aspettarsi che il sistema fosse più disordinato.

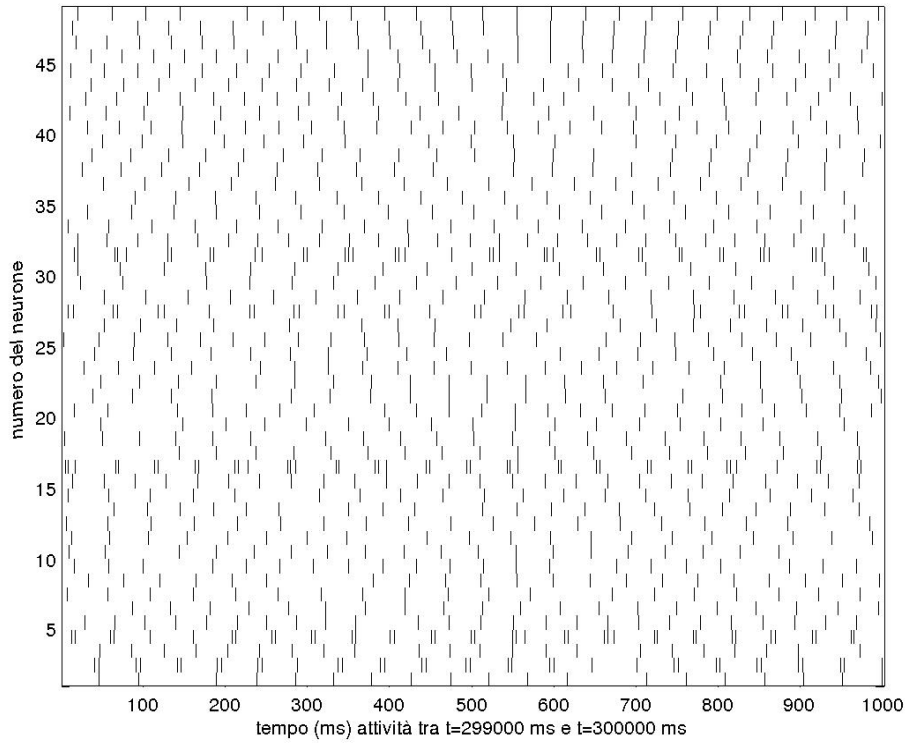


Figura 4.6: Emissione degli spike della rete autonoma con astroцити tra $t = 299000\text{ ms}$ e $t = 300000\text{ ms}$. Differentemente da quanto accadeva nel caso senza astroцити non sono presenti eventi di sincronizzazione globale.

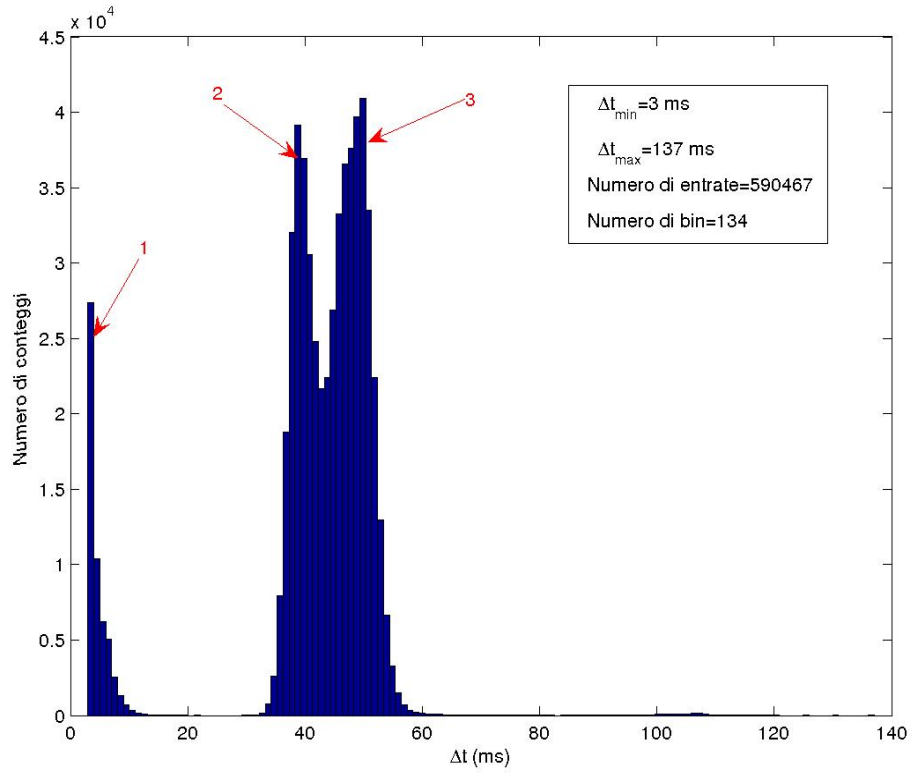


Figura 4.7: Istogramma della successione d di tutti gli intervalli inter-spike della rete in presenza di astrociti. I dati sono stati ottenuti simulando 500000 ms di attività. Non è più presente il picco sul valore del ritardo corrispondente alla frequenza delle onde alpha.

Capitolo 5

Conclusioni

Riassumiamo brevemente le motivazioni e i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi.

Mossi dall'idea di simulare una rete neuro-gliale per mettere in evidenza un possibile ruolo degli astrociti in una rete neurale abbiamo scelto e studiato il modello di Atri et al. per gli astrociti e quello di Izhihevich per i neuroni.

Le simulazioni effettuate nel capitolo 1 dimostrano che il modello di Atri et al. riproduce le caratteristiche essenziali della dinamica astrocitaria e, in particolare, delle onde di calcio astrocitarie. Le simulazioni hanno dimostrato che il mezzo astrocitario propaga vari tipi di fronti d'onda: è un mezzo eccitabile con attrito.

Le prime simulazioni di reti neuro gliali implementate (capitolo 3) hanno permesso di mappare l'evoluzione delle onde di calcio astrocitarie generate dall'attività della rete neurale sovrastante la matrice astrocitaria. E' stato possibile anche vedere che tale attività non è particolarmente influenzata dagli astrociti. Anche le proprietà medie della rete non sono alterate significativamente dalla presenza degli astrociti; la rete neurale in presenza di astrociti è, però, più eccitata e si ha una maggiore produzione di calcio medio nella matrice astrocitaria.

L'aumento di alcune quantità fenomenologiche (Q_{IP_3}) legate agli astrociti permette di mantenere attiva almeno una parte di una rete neurale che, in assenza del sincizio astrocitario, sarebbe completamente inattiva.

La presenza degli astrociti permette dunque di continuare l'elaborazione dell'input che ha generato l'attività nella rete neuro-gliale.

In una rete dotata di attività autonoma la presenza degli astrociti riduce la sincronizzazione temporale della rete. Questo può essere un meccanismo utilizzato dalla rete neuro-gliale per ridurre la presenza di scariche epilettiche.

Infine la distribuzione degli intervalli inter-spike della rete è fortemente influenzata dalla presenza degli astrociti. Se nella rete neurale senza astrociti

un neurone della rete, in media, emette sempre con una frequenza ben definita (ovvero è presente uno stato di emissione nettamente favorito rispetto agli altri) l'introduzione degli astrociti permette al neurone medio di esplorare due stati di emissione praticamente equiprobabili. Gli astrociti introducono quindi “un livello in più” di informazione nella rete neurale.

Bibliografia

- [1] Dani J. W., Cherjavsky A. e Smith S. J., Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks, *Neuron* 8, 429-440, 1992.
- [2] <http://www2.neuroscience.umn.edu/eanwebsite/CaWaves.html>
- [3] Nedergaard M., Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells, *Science* 263, 1768, 1994
- [4] Wilkins M., Sneyd J., Intercellular calcium spiral waves, *J.theor.Biol.* 191, 299-308, 1998
- [5] Weidmann S., The diffusion of radiopotassium across intercalated disks of mammalian cardiac muscle, *J.Physiol* 187,323-342.
- [6] Hunter P.F., McNaughton P.A. e Noble D. Analytical model of propagation in excitable cells, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 30, 99-144, 1975
- [7] Harris-White M.E., Zanutti S.A., Frautschy S.A. e Charles A.C., Spiral intercellular calcium waves in hippocampal slice cultures, *J. Neurophysiol.* 79, 1045-1052, 1998
- [8] Atri A., Amundson J., Clapham D. e Sneyd J., A single-pool model for intracellular calcium oscillations and waves in the *Xenopus laevis* oocyte. *Biophys. J.* 65, 1727-1739, 1993
- [9] Porter J. T. e McCarthy K. D., Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals, *J.Neurosci.* 16, 5073-81, 1996.
- [10] Arcuino G., Lin J.H.C., Takano T., Liu C., Jiang L., Gao Q., Kang J. e Nedergaard M., Intercellular calcium signaling mediated by point-source release of atp, *Proc.Natl.Acad.Sci.* 99, 9840-9845, 2002

- [11] Parpura V. e Haydon P., Physiological astrocyt calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons, *Proc.Natl.Acad.Sci.* 97, 8629-8634, 2000.
- [12] Sanderson M. J., Intercellular waves of communication, *News in Physiological Science* 11, 262-269,1996.
- [13] Nathanson M. H., Burgstahler A. D., Mennone A., Fallon M.B., Gonzalez C.B., Saez J.C., *American Journal of Physiology* 269, G167, 1995.
- [14] Robb-Gasper L.D., Thomas A.P., *J. Biol. Chem.* 270, 8102, 1995.
- [15] Dani J. W., Smith S. J., *Ciba Found. Symp.* 188, 195, 1995.
- [16] Nadkarni S., Jung P., Dressed neurons: modeling neural-glial interactions, *Phys. Biol* 1,35-41,2004
- [17] Izhikevich E. M., Which model use for cortical spiking neurons?,*IEEE Trans. on Neural Networks*,in press, settembre 2004.
- [18] Izhikevich E. M.,Simple model of spiking neurons,*IEEE Trans. on Neural Network* 14,No.6, novembre 2003.
- [19] Markram H., Toledo-Rodriguez M., Wang Y., Gupta A., Silberberg G. e Wu C., Interneurons of the neocortical inhibitory system, *Nature Neuroscience* 5, 793-807, 2004.
- [20] Kandel E.R., Schwartz J.H. e Jessel T.M., Principi di neuroscienze, Casa Editrice Ambrosiana, 1988.